As "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" têm por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos das Ciências Biológicas, Médicas e Químicas, elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros.

São publicadas sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores.

The "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" are the vehicle of communication for original papers written by national and foreign specialists who contribute to the progress of Biological, Medical and Chemical Sciences.

They are published under the direction of the Editorial Board which assumes no responsibility for statements and opinions advanced by contributors.

Diretor do Instituto Butantan
Dr. Willy Beçak

Comissão Editorial
Henrique Moisés Canter — Presidente
Adolpho Brunner Júnior — Membros
Olga Bohomoletz Henriques
Raymond Zelnik
Sylvia Lucas

Denise Maria Mariotti — Bibliotecária

Indexado/Indexed: Biosis Data Base, Chemical Abstract, Current Contents, Index Medicus.

Periodicidade: irregular
Permuta/Exchange: são feitas entre entidades governamentais, com publicações congêneres, mediante consulta prévia. Exchanges with similar publications can be settled with academic and governmental institutions through prior mutual agreement.
Endereço/Address. Instituto Butantan — Biblioteca. Av. Vital Brasil, 1.500
05504 — São Paulo, SP — Brasil
Telefone/Telephone: (011) 813-7222 — R. 129 — Telex: (011) 83325 BUTA-BR
Telefax: (011) 815-1505

SciELO

SUMÁRIO/CONTENTS

LAURO PEREIRA TRAVASSOS FILHO
1918 — 1989

"Quando alguém faz uma coisa porque gosta,
a gente tem tudo para se sentir bem ao lado dele"

Estas simples palavras de autor desconhecido, estavam bem a vista na sala de Lauro Pereira Travassos Filho e retratam perfeitamente o espírito de união desse magnífico homem que foi para nós muito mais que um chefe.

Mestre e amigo, Dr. Lauro partiu para sempre em maio de 1989.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

MORAES, R.H.P. Lauro Pereira Travassos Filho (1918-1989). *Mem. Inst. Butantan*, *51*(3):73-78, 1989.

Lauro Pereira Travassos Filho, nascido aos 7 de fevereiro de 1918 no Rio de Janeiro, teve desde pequeno a benéfica influência científica de seu pai Lauro Pereira Travassos, eminente helmintologista que o introduziu ainda em idade pré-universitária na Zoologia Médica do Instituto Oswaldo Cruz, ao que se seguiu a formação em Medicina (Escola Paulista de Medicina) e Ciências Naturais (Universidade de São Paulo), simultâneos com a freqüência na Parasitologia Animal do Instituto Biológico de São Paulo (SP), orientando-se definitivamente para a Entomologia, com preferência inicial para os lepidópteros.

Desde o início de sua carreira, participou de viagens científicas para coleta e estudo de material zoológico, integrando três das expedições biomédicas do Instituto Oswaldo Cruz, e organizou outras, com ênfase aos insetos de sua predileção — lepidópteros e mantódeos — desenvolvendo pesquisas zooecológicas de amplo espectro, dando incremento a várias coleções de lepidópteros noturnos do Museu de Zoologia, ex-Departamento de Zoologia da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, com mais de 30.000 exemplares. Graças a esses conhecimentos e a sua experiência, foi convidado a colaborar com a equipe de combate aos gafanhotos em 1947.

Em 1959, colaborou na instalação da Estação Biológica de Boracéia do Departamento de Zoologia.

Na sua especialidade, enfatizou a morfologia microscópica como eficientes recursos em taxonomia. Desenvolveu técnicas de conservação e procurou criar as espécies em laboratório, com conclusões valiosas em casos de dimorfismo e dicromatismo sexual, além dos dados das etapas evolutivas de significação bionômica, anotando os parasitos com vistas ao controle biológico.

Sendo fitófagas as larvas dos lepidópteros, estudou botânica para o conhecimento das plantas alimentícias, freqüentando o Instituto de Botânica, com o útil e recíproco entrosamento, adquirindo conhecimentos que o levaram a participar da Sociedade Brasileira de Floricultura, na qual, pela experiência editorial, foi também editor da revista Flores do Brasil, publicando artigos entomológicos e sobre o cultivo de plantas.

Quando na presidência da Sociedade Brasileira de Entomologia, editou os volumes 11 a 13 da Revista Brasileira de Entomologia e o Catálogo dos Papilionídeos Americanos. Por perda irreparável em 1976 do ilustre entomólogo e amigo Frei Walter Kempf, editor da Revista Studia Entomológica, foi solicitado a editar dois volumes (19 e 20), que foram os últimos dessa revista internacional de entomologia.

Pelas atividades próprias às suas pesquisas e contatos com laboratórios congêneres, participou de sociedades científicas, mais ativamente nas de entomologia. Por esse relacionamento foi indicado em 1959 pelo então Reitor da USP, para a Comissão de Risco de Vida e Saúde, primeiro com atuação nas áreas de pesquisas não diretamente relacionadas à Saúde Pública e, depois, como presidente, entrosando-se com a maioria dos Institutos do Estado de São Paulo.

Convidado em 1969 para o Instituto Butantan, reabriu a Seção de Parasitologia, fechada desde 1963 por falecimento do titular Prof. Dr. Flavio da Fonseca, retornando às pesquisas de combate à vetores , ao estudo de insetos e ácaros parasitos, além de iniciar um manual prático sobre insetos agressivos e larvas urticantes, que infelizmente não chegou a ver concluído.

Devido à amplitude de seus trabalhos, foi convidado e devidamente credenciado professor de Taxonomia de Insetos no Curso de Pós-graduação em Entomologia da Faculdade de Agronomia Luiz de Queiroz da USP — Piracicaba, de 1972 a 1977, desenvolvendo e consolidando seus conhecimentos de taxonomia de insetos, incentivando a colaboração de seus alunos e participando de bancas de teses. Participou ainda de cursos referentes a insetos agressivos e urticantes no Instituto Butantan e em Faculdades Médicas e Biomédicas.

Em fins de 1977, classificou-se por concurso em nível VI, ingressando na Carreira de Pesquisador Científico, passando a dar total dedicação à Seção de Parasitologia do Instituto Butantan.

Aposentado compulsoriamente aos 70 anos em 1988, e com a saúde abalada, não suportou o desligamento com a instituição e principalmente o afastamento do convívio diário de seus amigos. Pouco aproveitou de sua aposentadoria, porém tenho certeza de que partiu gratificado pela missão científica que cumpriu.

Ao amigo Travassos a nossa saudade e os nossos agradecimentos pelos ensinamentos legados.

Roberto Henrique Pinto Moraes
Pesq. Científico — Seção de Parasitologia

MORAES, R.H.P. Lauro Pereira Travassos Filho (1918-1989). *Mem. Inst. Butantan*, *51*(3):73-78, 1989.

LISTA DE TRABALHOS PUBLICADOS

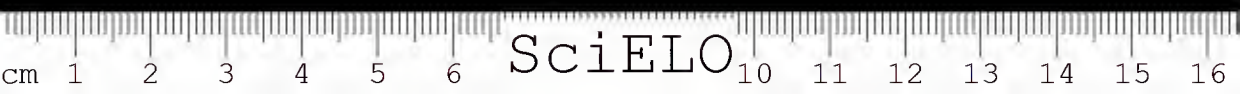
1. CARRERA, M. & TRAVASSOS FILHO, L.P. Dados morfológicos e bionômicos sobre *Hylemya poeciloptera* (Malloch, 1921) (Dip. Anthomydae), minadora das folhas de beterraba (Betavulgaris L.). *Pap. Avulsos Dep. Zool.*, *8*(4):49-60, 1947.
2. D'ANDRETTA, M.A.V. & TRAVASSOS FILHO, L.P. *Romualdisca dalmedai* n.g., n.sp. de Ctenuchidae (Lepidoptera). Liv. Homenagem R.F. d'Almeida SP, n.° 3:17-40, 1946.
3. Pd. MOURE, J. & TRAVASSOS FILHO, L.P. Notas sobre a nomenclatura dos grupos superiores e gêneros. *Publ. Avulsas Mus. Paranaense.* n.4. nov. 1947. 19p.
4. MUNAÓ DINIZ, L.S.; BELLUOMINI, H.E.; TRAVASSOS FILHO, L.P.; ROCHA, M.B. da. Presence of the ear mite *Otobius megnini* in the external ear canal of lions (Panthera leo). *J. Zoo Animal Med.*, *18*(4):154-155, 1987.
5. SANTOS, N. & TRAVASSOS FILHO, L.P. Aspecto médico e comentários sobre a localidade de Salobra (Estado de Mato Grosso). *Mem. Inst. Osw. Cruz*, *36*(3):311-20, 1941.
6. PEREIRA, C. & TRAVASSOS FILHO, L.P. O emprego de "Tatuzinhos", Oniscidae (Crustacea, Isopoda) na preparação de crânios de vertebrados. *Rev. Biol. Hyg.*, *5*(2):67-8, 1934.
7. PEREIRA, C. & TRAVASSOS FILHO, L.P. Sobre a ação anticulicídica das Planárias. *Rev. Biol. Hyg.*, *6*(1):22-30, 1935.
8. TRAVASSOS FILHO, L.P. Contribuição ao conhecimento dos Euchromiidae. Gênero *Corematura* Bult., 1876. (Lepidoptera). *Mem. Inst. Osw. Cruz*, *33*(2):259-62, 1938.
9. TRAVASSOS FILHO, L.P. Contribuição ao conhecimento dos Euchromiidae. Gênero *Cosmosoma* Hübner, 1827 (Lepidoptera). *Arq. Inst. Biológico*, *9*(6):59-66, 1938.
10. TRAVASSOS FILHO, L.P. Contribuição para o conhecimento dos Euchromiidae. V. Gênero *Isanthrene* Huebner, 1826. (Lepidoptera). *Bol. Biol.*, N.S. *4*(3):454-72, 1939.
11. TRAVASSOS FILHO, L.P. Nova espécie de *Ecdemus* (Herrich-Schaffer, 1854) (Lepidoptera-Euchromiidae). *Arq. Zool. Est. S. Paulo*, *1*(7):318-30, 1940.
12. TRAVASSOS FILHO, L.P. *Lepidoneiva*, novo gênero da família Euchromiidae. (Lepidoptera). Rev. Entomol., *11*(1-2):477-87, 1940.
13. TRAVASSOS FILHO, L.P. Notas de uma expedição realizada de fevereiro a março de 1940, às localidades de Ilha Seca, no Estado de São Paulo, e Salobra, no Estado de Mato Grosso. *Pap. Avulsos Dep. Zool.*, *1*:57-64, 1940.
14. TRAVASSOS FILHO, L.P. Euchromiidae de Salobra. (Lepidoptera). *Arq. Zool. Est. S. Paulo*, *2*(9):261-80, 1940.
15. TRAVASSOS FILHO, L.P. Contribuição à zoogeografia dos Euchromiidae brasileiros. I. Material colhido na Ilha Seca, Estado de São Paulo, e Salobra, Estado de Mato Grosso, de fevereiro a março de 1940. *Arq. Zool. Estado S. Paulo*, *2*(10):281-98, 1940.
16. TRAVASSOS FILHO, L.P. & CARRERA, D.M. *Xanthozona melanopyga (Widman, 1830) (Diptera. Tachinidae), predadora de Brassolis astyra* Godart, 1824 (Lep. Brassolidae), praga das palmeiras. Dados bionômicos dos dois insetos e morfológicos do tachinideo. *Arq. Zool. Est. S. Paulo*, *3*(3):43-74, 1941.
17. TRAVASSOS FILHO, L.P. Nota sobre *Lepidoneiva erubescens* (Butler, 1876) (Lep. Ctenuchidae). *Rev. bras. Biol.* , *3*(3):337-9, 1943.
18. TRAVASSOS FILHO, L.P. Excursão científica a Porto Cabral, margem paulista do rio Paraná. *Arq. Zool. Est. S. Paulo*, *4*(1):1-32, 1944.
19. TRAVASSOS FILHO, L.P. Interessante anomalia em um *Cosmosoma teuthras* (Walker, 1854) (Lepidoptera-Ctenuchidae). *Pap. Avulsos Dep. Zool.*, *4*(13):187-96, 1944.
20. TRAVASSOS FILHO, L.P. Ctenuchidae de Monte Alegre. *Pap. Avulsos Dep. Zool.*, *6*(4):29-36, 1944.
21. TRAVASSOS FILHO, L.P. Sobre as datas de publicações das "Mélanges Orthoptérologiques", de Henri de Saussure, com referência à Ordem *Mantodea* Burmeister, 1838. *Pap. Avulsos Dep. Zool.*, *6*(14):157-162, 1944.
22. TRAVASSOS FILHO, L.P. Última ecdise e período de fixação dos caracteres cromáticos alares no Mantodea. *Parastagmatoptera unipunctara* (Burmeister, 1838). Mantidae: Vatinae. *Pap. Avulsos Dep. Zool.*, *5*(12):95-106, 1945.
23. TRAVASSOS FILHO, L.P. Técnicas gerais seguidas no estudo da Ordem Mantodea. Burmeister, 1838. *Arq. Zool. Est. SP.*, *4*(5):113-156, 1945.
24. TRAVASSOS FILHO, L.P. Sobre a família Acanthopidae. Burmeister, 1838. *emend.* (Mantodea). *Arq. Zool. Est. SP.*, *4*(6):157-232, 1945.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

MORAES, R.H.P. Lauro Pereira Travassos Filho (1918-1989). *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):73-78, 1989.

25. TRAVASSOS FILHO, L.P. & CARRERA, M. Segunda expedição científica a Porto Cabral, margem paulista do rio Paraná. *Arq. Zool. Est. SP., 5*(2):89-134, 1946.
26. TRAVASSOS FILHO, L.P. Notas de nomenclatura. I — Estado atual dos gêneros *Methysia* Butler, 1876 e *Metamya*, novo nome para *Paramya* Druce, 1898 (Lep. Ctenuchidae). *Pap. Avulsos Dep. Zool., 7*(23):257-266, 1946.
27. TRAVASSOS FILHO, L.P. & PEREIRA, C. Comportamento da unidade em recipientes de barro poroso para a criação de artrópodos. *Pap. Avulsos Dep. Zool., 8*(10):123-126, 1947.
28. TRAVASSOS FILHO, L.P. Redescrição de *Pericopis picta* (Guerin, 1844) (Lep. Periscopidae), estudo de suas fases cromáticas e dados bionômicos. *Arq. Zool. Est. SP., 5*(7):483-538, 1947.
29. TRAVASSOS FILHO, L.P. & CARRERA, M. Contribuição para o conhecimento de *Pseudogavrax longilineatus* Sabrosky., parasita de ooteca de Mantodea (Dip. Chloropidae). *Rev. bras. Biol., 9*(1):97-101, 1949.
30. TRAVASSOS FILHO, L.P. On the priority of Ctenuchidae Kirby, 1837. *Lep. News., 3*(3):32, 1949.
31. TRAVASSOS FILHO, L.P. Líquido para preservação das estruturas internas de lepidopteros e demais insetos que habitualmente se montam em alfinetes. *Arq. Zool. Est. SP., 7*(7):439-444, 1950.
32. TRAVASSOS, L. & TRAVASSOS FILHO, L.P. Disschematidae, novo nome para Pericopidae Walker, 1869 (Lep. Heterocera). *Pap. Avulsos Dep. Zool. SP., 10*(2):77-91, 1951.
33. TRAVASSOS FILHO, L.P. Joaquim Franco de Toledo: 31-1-1905-17-5-1952. Dusenia, Curitiba, PR., *3*(5):330-342, 1952.
34. TRAVASSOS FILHO, L.P. Redescrição de *Corematura* Butler, 1876 e de suas duas espécies. (Lepidoptera-Ctenuchidae). *Arq. Zool. Est. SP., 8*(3):89-108, 1952.
35. TRAVASSOS FILHO, L.P. Riccia, novo gênero para *Corematura aliaria* (Druce, 1890) e descrição do alótipo dessa espécie. (Lep. Ctenuchidae). *Pap. Avulsos Dep. Zool., 11*(17):279-88, 1953.
36. TRAVASSOS FILHO, L.P. Baratas, indesejáveis insetos domésticos que somente criam problemas para o homem. *Folha da Manhã*, S. Paulo, Assuntos Gerais, 23 ago. 1953, p.5.
37. TRAVASSOS FILHO, L.P. "Distribuem-se por cerca de 150 mil espécies as borboletas e mariposas". (reportagem). *Folha da Manhã*, S. Paulo, Assuntos Especiais. 20 set. 1953, p.13.
38. TRAVASSOS FILHO, L.P. "Apresenta aspectos dos mais curiosos a evolução das borboletas e mariposas. (Reportagem). *Folha da Manhã*, S. Paulo, Assuntos Gerais. 10 out. 1953, p.5.
39. TRAVASSOS FILHO, L.P. & URBAN, H. Sobre a criação de pequenos Mantodea com insetos da Ordem Collembola. *Rev. bras. Ent., 1*:159-161, 1954.
40. TRAVASSOS, L. & TRAVASSOS FILHO, L.P. Contribuição ao conhecimento dos Arctiidae. (Lepidoptera) XXXIII — *Rhipha curicosilvai* n.sp. *Rev. bras. Ent., 1*:213-219, 1954.
41. TRAVASSOS FILHO, L.P. Notas de Nomenclatura. II. Prioridade de Druce (1898) em alguns gêneros de Ctenuchidae (Lep.) atribuídos a Hampson (1898). *Arq. Zool. Est. SP., 8*(10):333-340, 1954.
42. TRAVASSOS FILHO, L.P. "Algumas palavras". *Flores do Brasil*, SP. *1*(1):5-7, maio-1954.
43. TRAVASSOS FILHO, L.P. "Uma borboleta inimiga da Giesta". *Flores do Brasil*, SP., *1*(1):40-42, maio-1954.
44. TRAVASSOS FILHO, L.P. "As lagartas que comem as fôlhas das palmeiras". *Flores do Brasil*, SP. *1*(3):35-38, 1954.
45. TRAVASSOS FILHO, L.P. Mirandisca, novo gênero para *Cosmosoma harpalyce* Schaus, 1892, com descrição do *allotypus*. (Lep. Ctenuchidae). Vol. Homenagem A. Mir. Ribeiro. *Arq. Mus. Nacional*, RJ, *42*:669-682, 1955.
46. TRAVASSOS FILHO, L.P. A criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae). P. Nogueira Neto, Ed. Chac. & Quintais, SP, 280p. 44 fig., 1953. (comentário-bibliográfico). *Bol. Soc. Brasil. Ent.*, SP, *1*(6):46-47, 1955.
47. TRAVASSOS FILHO, L.P. Vermiculite — O grande recurso da moderna floricultura. *Flores do Brasil*, SP, *2*(2):83-87, 1956.
48. TRAVASSOS FILHO, L.P. Borboletas e mariposas (bruxas) — Insetos da Ordem Lepidoptera. *Chácaras e Quintais*, SP., *6*:849-851, 1956.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

MORAES, R.H.P. Lauro Pereira Travassos Filho (1918-1989). *Mem. Inst. Butantan*, *51*(3):73-78, 1989.

49. TRAVASSOS FILHO, L.P. — Contribuição ao conhecimento dos Ctenuchidae. (Lep.). VII: Gênero *Dinia* Walker, 1854. Arq. Zool. Est. SP., *10*(2): 185-207, 1957.
50. TRAVASSOS FILHO, L.P. "Em setembro provavelmente ocorrerá invasão ainda maior de mariposas (*Morpheis smerintha*). (Reportagem). *Folha da Manhã*, S. Paulo 23 abril 1958. p.20.
51. TRAVASSOS FILHO, L.P. Novas experiências com Vermiculite. *Flores do Brasil*, SP, *2*(4):187-191, 1958.
52. TRAVASSOS FILHO, L.P. & CAMARGO, H.F.A. A Estação Biológica de Boracéia. *Arq. Zool. Est. S. Paulo*, SP., *11*(1):1-21, 1958.
53. TRAVASSOS FILHO, L.P. "Da crisálida sombria sai a borboleta luminosa". (reportagem). *Diário de S. Paulo*, SP., p. 8-9, 1958.
54. TRAVASSOS FILHO, L.P. & CASTRO, M.P. "Clemente Pereira": 1-1-1906 — 30-10-1958. Anhembi, SP. 34 (100). 16p., mar. 1959.
55. TRAVASSOS FILHO, L.P. Comentários bionômicos e proteção pupal de *Dinia aeagrus* (Cr.) — Lep. Ctenuchidae. *Pap. Avulsos Dep. Zool.*, *13*(20):245-249, 1959.
56. TRAVASSOS FILHO, L.P. & HEITZMANN, T.J. Bionomia de Mantodea (Ins.) em laboratório. I - *Parastagmatoptera unipunctata* (Burn, 1838) (Mantidae — Vatine). *Arq. Zool. Est. S. Paulo*, *11*(8):171-192, 1960.
57. TRAVASSOS FILHO, L.P. Apresentação *in* Cat. Papilionidae Ame. Edição Soc. Bras. Ent., SP., maio 1966.
58. TRAVASSOS FILHO, L.P. & URBAN, H. Bionomia de *Dinia aeagrus* (Cr., 1779) (Lep. Ctenuchidae). *Pap. Avulsos Dep. Zool.* SP., *20*(18):217-222, 1967.
59. TRAVASSOS FILHO, L.P. Variação das manchas das asas de *Dirphia multicolor* fêmea. (Lep. Hemileucidae). *Rev. bras. Entomologia*, *12*:113-116, 1967.
60. TRAVASSOS FILHO, L.P. "Romualdo Ferreira d'Almeida": 1891-1969. *Studia Entomológica*, *12*(1-4):441-442, 1969.
61. TRAVASSOS FILHO, L.P. Dados bionômicos de *Gonioterma chlorina* e *G. exquisita*. (Lep. Stenomidae). *Studia Ent.*, *15*(1-4):485-496, 1972.
62. TRAVASSOS FILHO, L.P. *Triatoma williani* Galvão & Cols., 1965, capturado em Mato Grosso. BR., novo vetor da Moléstia de Chagas. *Mem. Inst. Butantan*, *36*:263-266, 1972.
63. TRAVASSOS FILHO, L.P. Sobre um ginandromorfo de *Citheronia laocoon* Cr., 1777. (Lep. Adelocephalidae.) *Studia Entom.*, *16*(1-4):523-528, 1973.
64. TRAVASSOS FILHO, L.P.; SOERENSEN, B.; HEITZMANN-FONTENELLE, T.J. Ação Larvi e Molusquecida do TEGO-51. *Mem. Inst. Butantan*, 37.317-325, 1973.
65. TRAVASSOS FILHO, L.P.; SOERENSEN, B. & *alii*. Sobre a erradicação da sarna de coelhos. II Jornada Cient. FCMBB, Botucatu, SP. Sec. L, p. 185, 1973.
66. TRAVASSOS FILHO, L.P. & HEITZMANN-FONTENELLE, T.J. Ouriço cacheiro (*Coendu villosus*) em laboratório. *In*: P. Nogueira Neto, *A criação de animais indígenas vertebrados*. SP. Ed. Tecnapis, 1973. p.270.
67. TRAVASSOS FILHO, L.P. "Borbolet, Lepidoptera, Mariposa". Enc. Mirador Intern., SP. pgs. 1476-1479, 6735-6737, 7253-7254, 1975.
68. TRAVASSOS FILHO, L.P. Broca da banana já tem nome! *O Biológico*, SP., *41*(12):364, 1975.
69. TRAVASSOS FILHO, L.P. "As abelhas africanas". Supl. Cult. "O Estado de S. Paulo", ano II, pgs. 11-12, 1978.
70. TRAVASSOS FILHO, L.P. "Frei Walter Kempf visto por amigo em tempo de pesquisa". *Studia Ent.*, *20*(1-4):23-26, 1978.
71. TRAVASSOS FILHO, L.P. "Mensagem aos colaboradores". *Studia Ent.*, *20*(1-4):31-32, 1978.
72. MORAES, R.H.P.; TRAVASSOS FILHO, L.P.; SOERENSEN, B.; FARINA, F.B. Presença de *Listrophorus gibbus* Pagenstecher, 1861 (Acarina, Listrophoridae), em criação de coelhos. *Rev. Latino-americana Cunicultura*, SP, *1*:49-52, 1980.
73. TRAVASSOS FILHO, L.P. "Vida dos insetos é debatida por congressistas". (Reportagem.) *Correio Braziliense*, DF, 1 fev. 1983, p.12.
74. TRAVASSOS FILHO, L.P. "Encerrado encontro de Entomologia". (Reportagem.) *Correio Braziliense*, DF, 5 fev. 1983, p.11.
75. VEIGA, R.M.O.; BORBA, H.L.; TRAVASSOS FILHO, L.P.; DOBBIN Jr., J.E. Contribuição para o conhecimento dos Triatominae Hemiptera, Reduviidae. I — *Triatoma melanocephala* Neiva & Pinto, 1923. *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*.355-365, 1980/81.
76. MORAES, R.H.P. & TRAVASSOS FILHO, L.P. Contribuição para o conhecimento das lagartas urticantes. I — *Cerodirphia avenata araguensis* Lemaire, 1971 (Lep. Attacidae.) *Mem. Inst. Butantan*, *44/45*:367-376, 1980/1981.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
51(3): 79-84, 1989

ADAPTAÇÕES EM ARMADILHA ENTOMOLÓGICA LUMINOSA DE SUCÇÃO

Roberto Henrique Pinto MORAES*
Rosa Maria de Oliveira VEIGA*
Ana Maria MARASSÁ*

RESUMO: Os autores descrevem no presente trabalho algumas modificações funcionais e estruturais, feitas em armadilha entomológica luminosa de sucção, objetivando um bom desempenho, fácil manejo e baixo custo na confecção do aparelho.
UNITERMOS: Armadilha luminosa. Flebotomíneos.

INTRODUÇÃO

As armadilhas entomológicas empregadas em levantamentos populacionais de espécies vetoras de moléstias ou pragas de lavouras variam quanto à forma e ao funcionamento.

Muitos são os modelos, podendo-se citar como exemplos os descritos por Lumsden[5], Minter[6], Thatcher[9] e Silveira Neto & Haddad[7].

Sendo tais armadilhas, de modo geral, utilizadas em trabalhos de campo, torna-se fator imprescindível a simplicidade na montagem, transporte e funcionamento. Com relação a esses aspectos, pode-se apontar a armadilha luminosa de sucção CDC-miniatura, desenvolvida por Sudia & Chamberlain[8], com modificações realizadas por Gomes *et al.*[4], que é prática e de bom desempenho, porém de custo pouco acessível.

Uma variação da armadilha de Chaniotis & Anderson[2], descrita por Falcão[3], e posteriormente modificada por Aguiar *et al.*[1], foi utilizada pelos autores em levantamentos flebotomínicos no Horto Oswaldo Cruz do Instituto Butantan - SP e na Fazenda São Joaquim do mesmo Instituto em São Roque - SP, demonstrando ter os quesitos necessários para uma boa coleta.

O presente trabalho tem como objetivo apresentar novas modificações

---

* Seção de Parasitologia
Instituto Butantan, C.P. 65 01051 — São Paulo — SP — Brasil
Recebido para publicação em 19.1.1989 e aceito em 4.5.1989.

e adaptações desta armadilha que se julgaram adequadas para um melhor funcionamento, fácil manejo e menor custo de fabricação.

MATERIAL E MÉTODOS

Basicamente a estrutura geral da armadilha é a mesma descrita por Falcão[3], que consiste de: um tubo de PVC de 4'', com 20cm de comprimento, tendo numa extremidade uma "luva" de PVC de 4'', onde é acoplado o motor, e na outra um "cap" de 4'' (também de cano para esgoto), do mesmo material contendo uma válvula para pia, por onde entram os insetos que são impedidos de atingir a hélice, devido a uma tela situada na câmara coletora.

Quanto ao "chapéu" protetor da armadilha, também se utilizou um suporte para plantas como o descrito por Aguiar *et al.*[1]

As modificações realizadas foram as seguintes:

— Modificações na estrutura da armadilha (Desenho 1 e Foto 1).

1 — A haste de sustentação, o suporte do motor e o suporte da lâmpada foram confeccionados em PVC. Originalmente estes eram feitos de alumínio.

2 — Na armadilha de Falcão[3] modificada por Aguiar *et al.*[1], a haste de sustentação era conectada à luva ou ao cap, o que não era muito seguro, visto que essas duas peças são encaixadas no corpo da armadilha. Dessa forma idealizou-se nova haste inteiriça que é presa ao chapéu por um único parafuso e conectada ao corpo por dois parafusos.

3 — Para que haja firmeza entre o corpo e a haste, colocaram-se nessas partes fitas aderentes autocolantes*.

4 — Um funil de plástico branco foi adaptado à entrada da câmara coletora para ampliar a área de sucção.

5 — A armadilha foi revestida externamente por papel colante** preto, excetuando-se apenas os frisos do cap e da luva, bem como todo o funil.

— Modificações no funcionamento (Desenho 1 e Foto 1).

1 — Utilizou-se um motor de 9 Volts de toca-fitas, alimentado por duas pilhas de 1,5V. Na armadilha original, o motor era de 6V. O motor pode ser operado com duas pilhas grandes ou pequenas, ou ainda, em 110 ou 220V, por meio de um conversor para 6V, colocado no chapéu, juntamente com os suportes para pilhas grandes. O suporte para pilhas pequenas foi colocado na luva, onde está o motor.

2 — A posição da fonte luminosa também foi modificada, sendo a lâmpada de 6,3V, colocada dentro da câmara coletora, logo acima da entrada, alimentada por quatro pilhas grandes de 1,5V, colocada também no chapéu.

---

* Conhecidas comercialmente por Velfix ou Fixa Fácil.

** Marca Contact.

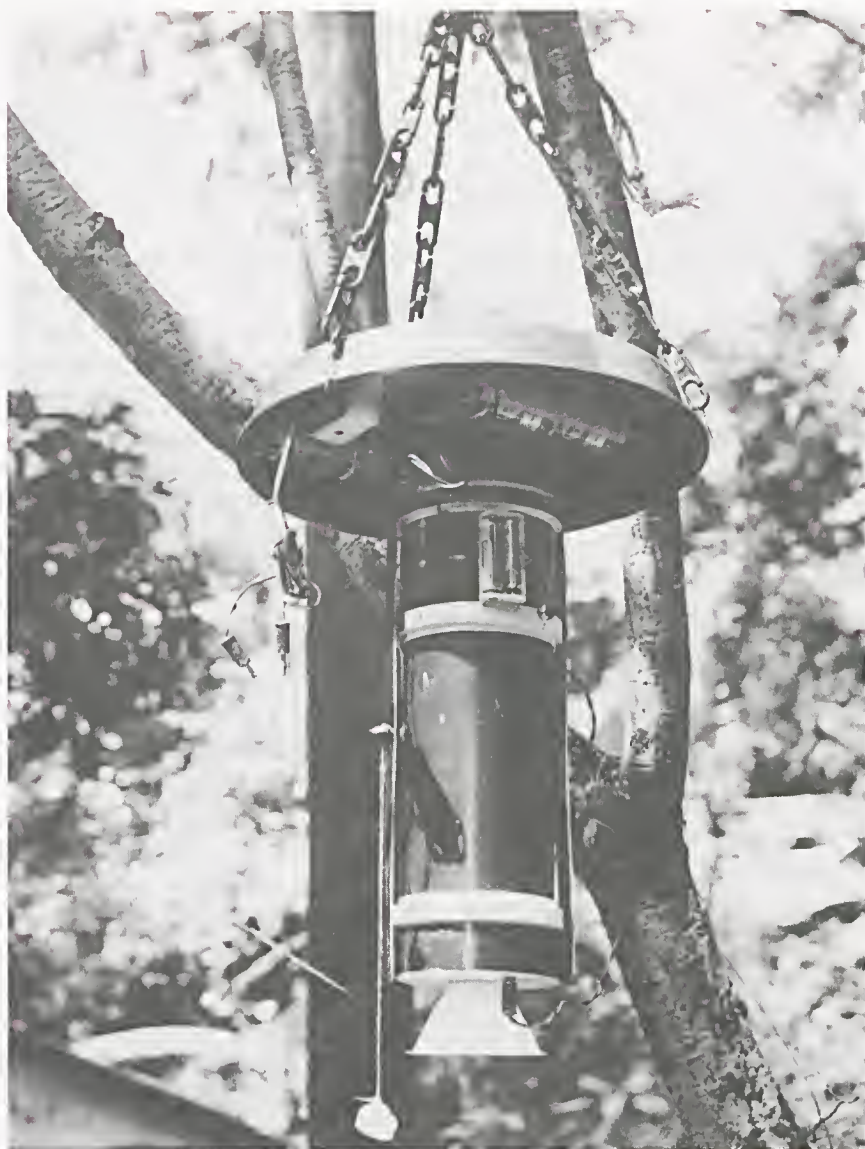
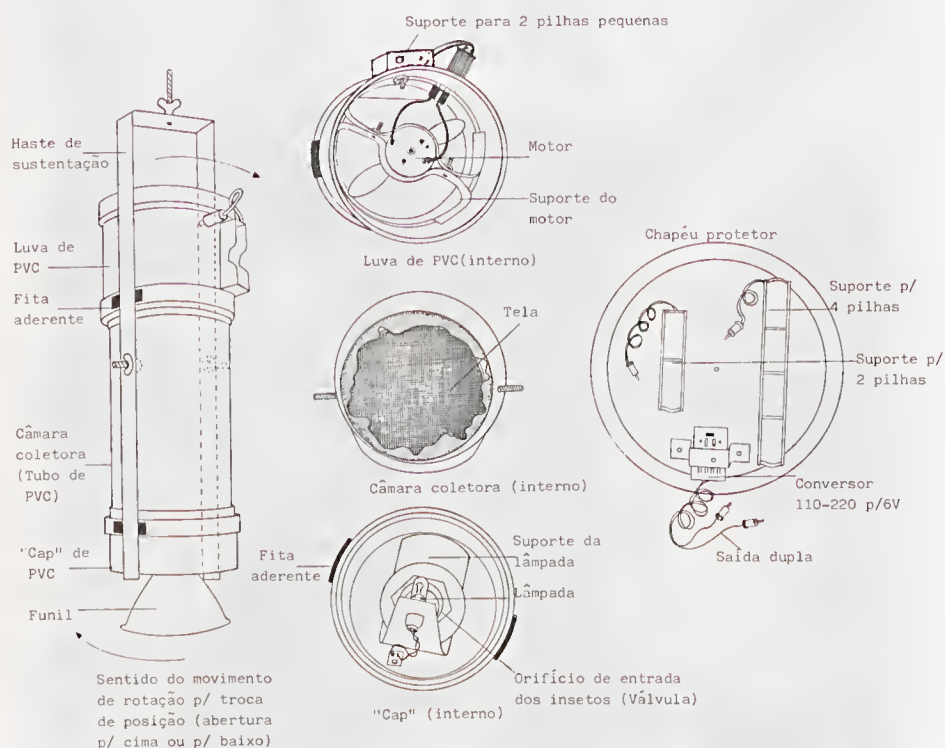



Foto 1 — Armadilha luminosa de sucção, utilizada para captura de flebotomíneos, na mata do Horto Oswaldo Cruz do Instituto Butantan — SP.

Desenho 1 — Desenho esquemático das partes que compõem a armadilha luminosa de sucção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com as modificações estruturais, obteve-se maior segurança na sustentação do aparelho e maior facilidade quando da troca (se necessária) da câmara coletora, ou somente da posição desta, com a entrada para cima ou para baixo, bastando para isso girá-la e fixá-la por meio das fitas aderentes.

A substituição das partes feitas em alumínio, por PVC, reduz o custo de fabricação.

O funil, colocado na entrada da câmara coletora, torna o diâmetro de sucção maior e, sendo este de cor branca, quando colocado em local escuro, reflete a luz interna, podendo ser visto a longa distância.

Julgou-se importante a transferência da lâmpada para dentro da armadilha visto que, numa eventual pane do motor, os insetos continuam no interior da armadilha, atraídos pela luz.

Com a armadilha revestida de papel colante preto, evita-se que a luz interna seja transmitida para todo o aparelho, ficando concentrada apenas no funil.

Com relação às modificações funcionais, pode-se dizer que o rendimento do motor de 9V, alimentado por duas pilhas de 1,5V, é significativo, visto que com esta voltagem (3V), o motor desenvolve 2.000 RPM, o que, além de não sobrecarregar as pilhas, é o suficiente para a sucção de insetos leves, como os flebotomíneos.

Foram testados alguns tipos de pilhas pequenas e grandes de 1,5V, sendo recomendadas para o motor as alcalinas, cujo rendimento médio foi de 36 horas com as pilhas pequenas, sendo o dobro para as grandes.

Para a lâmpada, obteve-se bons resultados com quatro pilhas grandes alcalinas de 1,5V, cujo rendimento médio foi de 44 horas, divididas em períodos de 11 horas, com repouso de 24 horas em refrigerador.

No conversor de voltagem 110/220 para 6 volts, fez-se outra saída além da original, tornando bastante funcional a operação do motor e da lâmpada com apenas um conversor, sem interferir na qualidade de sucção e iluminação.

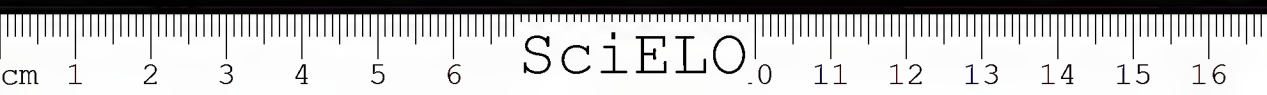
ABSTRACT: The authors describe in this paper some functional and structural modifications in the entomological suction light trap, providing a good performance and easy employment, without high costs.
KEYWORDS: Light trap. Sand flies.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Fernando de A. Corrêa, do Laboratório Especial de Zoonoses e Endemias Parasitárias do Instituto Butantan, pelas sugestões apresentadas.

MORAES, R.H.P.; VEIGA, R.M. de O.; MARASSÁ, A.M. Adaptações em armadilha entomológica de sucção. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):79-84, 1989.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUIAR, G.M. *et. al.* Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. IV — Freqüência mensal em armadilhas luminosas. (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 80*(4) : 465-482, 1985.
2. CHANIOTIS, N.N. & ANDERSON, J.R. Age structure, population dynamics and vector potential of *Phlebotomus* in Northern California. *J. Med. Ent., 5*(3): 273-292, 1968.
3. FALCÃO, A.R. Um novo modelo de armadilha luminosa de sucção para pequenos insetos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 76*(3): 303-305, 1981.
4. GOMES, A.C.; RABELLO, E.X.; NATAL, D. Uma nova câmara coletora para armadilha CDC-miniatura. *Rev. Saúde Publ., 19*: 190-191, 1985.
5. LUMSDEN, W.H.R. A trap for insects biting small vertebrates. *Nature* 181:819-820, 1958.
6. MINTER, D.M. A modified Lumsden suction-trap for biting insects. *Bull. Ent. Research, 52*(2): 233-297, 1968.
7. SILVEIRA NETO, S. & HADDAD, M.L. Teste comparativo entre as coletas das armadilhas luminosas "Luiz de Queiróz" e "Intral". *Ecossistema, 9*: 87-91, 1984.
8. SUDIA, W.D. & CHAMBERLAIN, R.W. Battery operated light trap, an improved model. *Mosquito News, 22*: 126-129, 1962.
9. THATCHER, V.E. Studies of Phlebotominae sandflies using castor oil traps baited with panamanian animal. *J. Med. Ent., 5*(3): 293-297, 1968.

Mem. Inst. Butantan
51(3):85-90, 1989

HIPERIMUNIZAÇÃO DE CAVALOS SOROPRODUTORES COM VENENOS BOTRÓPICOS E CROTÁLICO TRATADOS POR GLUTARALDEIDO

Rosalvo GUIDOLIN*
Wilmar DIAS da SILVA**
Hisako Gondo HIGASHI*
Celso Pereira CARICATI***
Maria Laura S.R. LIMA*
Josefina Farina MORAIS*
José Ricardo PINTO****
José Roberto MARCELINO*

RESUMO: Veneno de *Crotalus durissus terrificus* (5mg) e a mistura de veneno (5mg) de sete espécies do gênero *Bothrops (B. jararaca, B. jararacuçu, B. neuwiedi, B. moojeni, B. alternatus, B. cotiara* e *B pradoi*), não tratados e insolubilizados pela ação de 0,34% de glutaraldeido, incorporados em adjuvante oleoso tipo emulsão múltipla, foram utilizados para imunizar cavalos. Uma semana após os animais foram reinoculados com o antígeno incorporado ao adjuvante emulsão múltipla incompleto e depois, com o intervalo acima citado foram reinoculados com os mesmos antígenos adsorvidos ao hidróxido de alumínio. A reimunização dos animais foi feita 30 dias após a última dose do ciclo básico, constando de: uma dose de antígenos incorporados em adjuvante oleoso e três doses de antígenos adsorvidos ao hidróxido de alumínio, com um intervalo de sete dias entre a primeira e a segunda dose e de dois dias entre as demais. Amostras de sangue foram coletadas imediatamente antes de cada inoculação e os anticorpos circulantes foram determinados pelos métodos de floculação e neutralização frente aos venenos de referência, correspondentes. As reações locais e sistêmicas observadas nos cavalos foram consistentemente reduzidas ou ausentes, nos animais que receberam os venenos tratados pelo glutaraldeido quando comparadas com aquelas dos animais imunizados com venenos não tratados. Por outro lado, o título de anticorpos no soro de todos os animais foi praticamente o mesmo. Esta experiência indica que o glutaraldeido reduziu a atividade tóxica dos venenos sem alterar a sua imunogenicidade.
UNITERMOS: Veneno serpentes. Glutaraldeido. Antiveneno

---

* Seção de Concentação e Fracionamento de Soros
** Seção de Imunoquímica
*** Seção de Soros — Fazenda São Joaquim
**** Seção de Veterinária — Fazenda São Joaquim — Instituto Butantan — C.P. 65 — 01051 — São Paulo-SP-Brasil
Recebido para publicação em 11.8.1988 e aceito em 16.5.1989.

GUIDOLIN, R.; DIAS da SILVA, W.; HIGASHI, H.G.; CARICATI, C.P.; LIMA, M. L. S. R.; MORAIS, J. F.; PINTO, J. R.; MARCELINO, J.R. Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópicos e crotálico tratados por glutaraldeido. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):85-90, 1989.

INTRODUÇÃO

Para a obtenção de plasmas hiperimunes antibotrópicos e anticrotálicos, os cavalos são inoculados com diversas doses dos venenos dessecados que normalmente possuem atividade tóxica elevada. Com relativa freqüência são observadas reações locais e sistêmicas que podem levar, inclusive, o animal à morte. O presente trabalho tem por finalidade a verificação do nível de resposta imunitária em cavalos hiperimunizados segundo um esquema básico, para o qual os venenos tiveram a sua atividade tóxica reduzida pela ação de glutaraldeido (GA)[2,7] e, a seguir, reimunizados com os mesmos venenos não destoxicados.

MATERIAL E MÉTODO

1. *Animais*:

1.1 Soroprodutores: cavalos, machos, jovens de um ano a um ano e meio, pesando entre 110 e 150 quilos, divididos em quatro grupos de cinco animais, segundo as espécies de venenos inoculados e esquemas de vacinação.
1.2 Testes: pombos de 250 a 320g.

2. *Antígenos (AG)*:

— botrópico: mistura de 50% de veneno de *B. jararaca* e de 8.33% de cada um dos seguintes venenos:
B. *alternatus*, B. *cotiara*, B. *jararacuçu*, B. *moojeni*, B. *neuwiedi* e B. *pradoi*
— crotálico: veneno de *Crotalus durissus terrificus*
— atividade tóxica dos venenos: determinada pela inoculação endovenosa em pombos[5], demonstrou ser para os venenos considerados, as seguintes:

B. *jararaca*	— 30 µg
B. *alternatus*	— 45 µg
B. *cotiara*	— 45 µg
B. *jararacuçu*	— 7,5 µg
B. *neuwiedi*	— 25 µg
B. *pradoi*	— 4 µg
Crotalus durissus terrificus	— 1,5 µg

3. *Preparação dos Antígenos*:

3.1 botrópico: a mistura de venenos botrópicos, nas proporções acima indicadas, foi dissolvida em solução salina estéril de modo a conter:
3.1.1 5mg em 2,5ml (grupo I)
3.1.2 10 mg em 2,5ml (grupo II)
3.2 crotálico: foi dissolvido em solução salina estéril de modo a conter:
3.2.1 5mg em 2,5ml (grupo III)
3.2.2 10mg em 2,5ml (grupo IV)

Os volumes preparados foram suficientes para todas as inoculações previstas nos esquemas básicos de hiperimunizações. As soluções foram centrifugadas a 800g a 4°C durante 15 minutos para eliminação de partícu-

las insolúveis. Durante os intervalos entre uma e outra fase de tratamento, as soluções eram mantidas a 4°C.

3.3 Tratamento pelo glutaraldeido: foi utilizada a técnica de Weir[8].

4. *Adjuvantes*: Foram utilizados como potencializadores o adjuvante oleoso emulsão múltipla[4] completo (AOEM-C) e incompleto (AOEM-I) em volumes de 2,5ml, na primeira e segunda doses, respectivamente. Às demais doses foram adicionados 2,0mg/100ml de hidróxido de alumínio às soluções de venenos com pH 7,0 e 7,5 para a mistura de botrópicos e crotálico, respectivamente. Os volumes totais foram de 5ml para as duas primeiras doses e 10ml para as restantes, sendo que nestas o volume foi completado com solução a 0,85% de NaCl.

5. *Técnica e Vias de inoculação*: As duas primeiras doses de 5ml (com adjuvante oleoso) foram inoculadas por via subcutânea, no dorso do animal, em dois pontos (2,5 ml em cada ponto) separados por uma distância aproximada de 25cm. As doses subseqüentes (10ml) foram subdivididas em quatro porções, igualmente distribuídas ao redor dos pontos de inoculação das duas primeiras doses.

6. *Esquema de hiperimunização*:

6.1 básica: uma dose com AOEM-C e a seguinte com AOEM-I e sete doses com hidróxido de alumínio. O intervalo entre as doses foi fixado em sete dias.

6.2 reimunização: efetuada após 30 dias de repouso para recuperação dos animais com: uma dose de 7,5mg da mistura de venenos botrópicos ou do veneno crotálico normal (sem tratamento pelo GA), em AOEM-I, volume total de 5ml, preparada e inoculada como antes indicado. As 2.ª, 3.ª e 4.ª doses continham 2,5mg dos venenos e hidróxidos de alumínio, volume total de 10ml, preparadas como anteriormente indicado. Os intervalos entre as doses foram os seguintes: entre a primeira e a segunda doses, 7 dias. Entre as demais doses, 2 dias.

7. *Sangrias*: O sangue foi extraído 10 dias depois da última dose de Ag, por punção da veia jugular e o soro separado após a coagulação em câmara fria.

8. *Testes*:

8.1 Atividade neutralizante dos soros:

8.1.1 "in vitro" para o soro anticrotálico pela técnica de floculação[1];

8.1.2 "in vivo" para os soros antibotrópico e anticrotálico pelo método de Vital Brazil[3].

9. *Estudo comparativo*: Duas turmas de cavalos soroprodutores, uma de plasma antibotrópico e a outra de plasma anticrotálico, serviram como referência. Os esquemas de hiperimunização básica e reimunização foram efetuados como descrito para os grupos I e III de cavalos, com venenos não tratados pelo glutaraldeido. Para a avaliação dos resultados foram utilizados os mesmos testes indicados anteriormente, item 8.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As atividades tóxicas para pombos inoculados intravenosamente com a mistura de venenos botrópicos e com o veneno crotálico normais foram 40

SciELO

e 1,5 μg, respectivamente. Após o tratamento pelo GA, como indicado, pombos semelhantes não apresentaram qualquer sintoma de envenenamento ao receberem 80 e 3,0 μg, por via intravenosa da mistura de venenos botrópicos e de veneno crotálico, respectivamente.

As tabelas I e II demonstram os resultados obtidos pela titulação dos plasmas dos animais pelo método de Vital Brazil[3], expressos em mg de veneno de referência neutralizados por 1 ml de plasma. Deve ser ressaltado que a morte de 3 animais entre 5 inoculados, pertencentes ao Grupo I, impossibilitou estudo comparativo quanto à eficácia de doses de 5mg de veneno (Grupo I) e 10mg (Grupo II).

A mortalidade observada entre os animais do Grupo I, não está relacionada à inoculação do veneno, pois ela não ocorreu entre os animais do Grupo II que receberam doses de 10mg. Os animais disponíveis para os testes eram ainda muito jovens e de baixo peso para a finalidade de produção de soros. Entre os animais imunizados com o veneno crotálico verifica-se (Tabela II) que as doses de 5mg (Grupo III) foram mais satisfatórias, nas condições da experiência. Se compararmos estes resultados com aqueles obtidos pela imunização de cavalos adequados à soroprodução (turmas de produção rotineira), tratados com o mesmo esquema, com doses de 5mg de venenos, observamos que no serviço de plasma antibotrópico, o tratamento dos venenos pelo GA parece não ser a técnica de escolha. No entanto, para os animais produtores de plasma anticrotálico os resultados obtidos com o veneno tratado pelo GA foram mais satisfatórios. A turma 3 de serviço anticrotálico, produção normal, apresentou em média (50 cavalos) atividade neutralizante de 0,24mg e 0,40mg nos ciclos básicos e de reimunização, respectivamente. Uma outra observação que merece destaque é quanto à redução das reações locais observadas, em comparação com as reações desenvolvidas nos animais de produção normal. Além do tratamentc dos venenos pelo GA, acreditamos que a utilização do adjuvante oleoso tipo emulsão múltipla, em volume de 2,5ml, contribuiu com grande parcela na redução das reações.

TABELA I
Atividade neutralizante dos soros de cavalos hiperimunizados com a mistura de venenos botrópicos tratada pelo GA. Ciclos básico e de reimunização.

Grupo	Cavalo N.°	Título * mg/ml	
		Ciclos	
		Básico	Reimuniz.
I	4	<0,2	+
	6	<0,2	+
	7	<0,2	0,4
	17	<0,2	0,3
	19	<0,2	+
II	9	<0,2	1,0
	14	<0,2	2,0
	16	<0,2	0,3
	26	<0,2	0,3
	29	<0,2	0,4

* 10 dias após a última dose
\+ morto

GUIDOLIN, R.; DIAS da SILVA, W.; HIGASHI, H.G.; CARICATI, C.P.; LIMA, M. L. S. R.; MORAIS, J. F.; PINTO, J. R.; MARCELINO, J.R. Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópicos e crotálico tratados por glutaraldeido. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):85-90, 1989.

TABELA II

Atividade neutralizante dos soros de cavalos, hiperimunizados com o veneno crotálico tratado pelo GA. Ciclos básico e de reimunização.

Grupo	Cavalo n.º	Título * mg/ml			
		Ciclos			
		Básico		Reimunização	
		"in vitro"	"in vivo"	"in vitro"	"in vivo"
III	3	0,4	–	0,9	>0,8
	5	0,2	–	0,6	>0,8
	21	0,2	–	0,5	>0,8
	27	0,0	–	0,7	>0,8
	30	0,2	–	0,6	>0,8
IV	1	0,0	–	0,2	0,5
	2	0,2	–	+	+
	20	0,1	–	0,5	0,5
	23	0,0	–	0,6	0,5
	25	0,0	–	0,3	0,5

* 10 dias após a última dose
\+ morto
\- não feito

ABSTRACT: *Crotalus durissus terrificus* (5mg) venoms and the mixture (5mg) of seven species from the genus *Bothrops* (*B. jararaca; B. jararacuçu; B. neuwiedi; B. moojeni; B. alternatus; B. cotiara* and *B. pradoi*) untreated and insolubilized by cross-linking with 0,34% of glutaraldehyde incorporated in complete oil adjuvant multiple emulsion were used to immunize horses. One week later the animals were reinjected with the same antigens incorporated in incomplete oil adjuvant multiple emulsion. After one week they were reinjected with the same antigens incorporated in aluminium hidroxyde. Thirty days later a new boosters cicle with two antigen injections were given subcutaneously: the first injection of antigens in oil adjuvants and the three ones incorporated in aluminium hidroxyde, at intervals of one week the first and the second injections. Samples of blood were collected just before each injections and the sera were used to determine the antibodies titers against the correspondent whole venoms by the floculation and neutralization methods. The local tissues damage and the systemic reactions were consistently reduced or even absents in the animals receiving the cross-linking antigens as compared with those injected with crude venoms. Nevertheless, the titers of antibodies in the sera from all animals were almost the same. This experiment indicates that the cross-linking of the venoms with glutaraldehyde reduced their toxic activities but did not change their immunogenic capacity.
KEYWORDS: Cross – linking venoms. Snake venoms. Glutaraldehyde. Antivenoms.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

GUIDOLIN, R.; DIAS da SILVA, W.; HIGASHI, H.G.; CARICATI, C.P.; LIMA, M. L. S. R.; MORAIS, J. F.; PINTO, J. R.; MARCELINO, J.R. Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópicos e crotálico tratados por glutaraldeido. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):85-90, 1989.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários e servidores do Setor de Imunização e Seção de Concentração e Fracionamento de Soros, pela valiosa colaboração no decorrer do desenvolvimento do presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARANTES, J.B.; KARMANN, G.; BIER, O.R. Emprêgo da reação de floculação específica na dosagem do antiveneno crotálico. *Mem. Inst. Butantan, 18:21-26, 1944/45.*
2. *AVRAMEAS, S. & TERNYNCK, T. The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunobsobents. Immunochemistry, 6*:53, 1969.
3. BRAZIL, V. Dosagem do valor antitóxico dos seruns antipeçonhentos. *Rev. med. S. Paulo, 10*:457-62, 1907.
4. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2 ed. São Paulo, Indústria Gráfica Siqueira S.A., 1959. p. 1027-35.
5. HERBERT, W.J. Multiple emulsions. Form of mineral-oil antigen adjuvant. *The Lancet, 2*:771, 1965.
6. HUANG, R.J.; CHEN, S.W.; CHEN, T.K.; LION, M.Y. The detoxification of *Naja naja atra* venom and preparation of potent antivenin. *Chung Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien I Hsuch Tsa Chin, 18*(3):177-83, 1985 (Resumo)
7. RELYVELD, E.H. & BEN — EFRAIM, S. Preparation of vaccines by the action of glutaraldehyde on toxins, bacteria, viruses, allergens and cells. In: LANGONE, J.J. & VAN VUNAKIS, H. *Methods in Enzymology.* New York, Academic Press, 1983. v. *93* (F), p. 24-60.
8. WEIR, D. M. Handbook of experimental immunology. 3. ed. Oxford, Blackweel Scientific Publication, 1978.

Mem. Inst. Butantan
51(3):91-100, 1989.

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTIVENENO TOTAL DE *CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS* EM CAVALOS POR FOSFOLIPASE A_2

Hisako Gondo HIGASHI **
Rosalvo GUIDOLIN **
Amélia Keiko NISHIKAWA **
Ivone Kazuko YAMAGUCHI **
Marco Antonio STEPHANO **
Maristela JOSÉ dos SANTOS **
Wilmar DIAS da SILVA *
Celina M. P. M. UEDA ***

RESUMO: Fosfolipase A_2 purificada de veneno de *Crotalus durissus terrificus* ou veneno integral foram usados, como antígenos, para imunizar cavalos e burros. A imunização de base foi feita injetando os animais, pela via subcutânea, com 5mg do antígeno emulsionado em adjuvante de Freund completo. Quatro meses depois, os animais foram reimunizados injetando-se os antígenos correspondentes, dissolvidos em salina, ao redor dos granulomas resultantes da imunização primária. Esta injeção foi repetida por mais cinco vezes a intervalos de uma semana. Amostras de sangue eram colhidas antes de cada injeção e os soros congelados a – 20°C. Anticorpos antiveneno crotálico integral contendo crotamina foram titulados, em todas as amostras de soro, pelos métodos de floculação, imunodifusão, e por ELISA.
Os animais injetados, quer com fosfolipase A_2 quer com o veneno integral, produziram anticorpos contra o veneno crotálico bruto, os títulos obtidos sendo praticamente os mesmos. A análise eletroforética em celogel dos soros mostrou: — consistente redução nos valores percentuais da fração albumina e um correspondente aumento na fração de globulinas, principalmente das globulinas δ 2; as globulinas α 1 tornam-se mais evidentes enquanto as globulinas α 2 reduzem-se. Esses resultados indicam que a fosfolipase A_2 é capaz de induzir uma boa resposta primária dos antígenos do veneno crotálico e que ela pode ser usada nas imunizações de rotina para a produção de soros antiveneno crotálico para fins terapêuticos.

UNITERMOS: Fosfolipase A_2. Veneno crotálico. Anti-soro. Veneno de cascavel.

* Laboratório Especial de Imunoquímica
** Seção de Concentração e Fracionamento de Soros
*** Laboratório Especial de Biotecnologia
Instituto Butantan — CP 65 — 01051 — São Paulo-SP — Brasil.
Recebido para publicação em 13.9.1988 e aceito em 19.5.1989.

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; STEPHANO, M. A.; JOSÉ dos SANTOS, M.; DIAS da SILVA, W.; UEDA, C. M. P. M. Produção de anticorpos antiveneno total de *Crotalus durissus terrificus* em cavalos por fosfolipase A_2. *Mem. Inst. Butantan*, *51*(3):91-100, 1989.

INTRODUÇÃO

A Crotoxina, o principal componente neurotóxico do *Crotalus durissus terrificus*, é composta por duas proteínas, uma altamente básica, a fosfolipase A_2 (fosfatidato 2 — acilhidrolase, EC 2.1. 1.4) e outra ácida, a crotapotina[3]. Quando o complexo é dissociado em seus componentes fosfolipase A_2 e crotapotina, sua atividade neurotóxica original desaparece enquanto sua atividade hemolítica *in vitro* ensaiada na presença de lecitina permanece restrita à fosfolipase A_2; ambas atividades, são, contudo, restauradas de maneira sinérgica, quando fosfolipase A_2 e crotapotina se reassociam[5, 6, 10, 11]. Tem sido também demonstrado, usando crotoxina radioativamente marcada, que a porção crotapotina serve como transportador para a fosfolipase A_2 e, como ligante, servindo de ponte entre o complexo neurotóxico e os tecidos sobre os quais a toxina atua[7, 3, 1]. Coelhos imunizados com fosfolipase A_2 purificada de veneno de *C.d. terrificus* produzem anticorpos capazes de neutralizar a atividade neurotóxica presente na crotoxina purificada[4] ou no veneno crotálico bruto[2]. Camundongos imunizados com fosfolipase A_2 tornam-se resistentes à ação letal do veneno crotálico bruto, a resistência adquirida estando diretamente relacionada aos títulos de anticorpos séricos específicos para a crotoxina determinados pelo método de ELISA[12].

O presente trabalho foi delineado com o objetivo de verificar se preparações purificadas de fosfolipase A_2 podem ser usadas na imunização de base, nos esquemas de imunização destinados à produção de soros hiperimunes antiveneno crotálico.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Foram usados 8 equídeos sendo 4 muares (M) e 4 cavalos (C). Os animais M-84, M-85, C-334 e C-364 (Grupo I) e M-220, M-381, C-394 e C-548 (Grupo II) foram mantidos na "Fazenda São Joaquim" do Instituto Butantan nas mesmas condições e recebendo os mesmos cuidados que os animais utilizados para a produção de soros hiperimunes.

Antígenos: Veneno crotálico contendo crotamina foi obtido de serpentes *C.d. terrificus* mantidas no serpentário do Instituto Butantan. O veneno foi colhido pelo método de rotina, dessecado e mantido a 4°C sob ambiente seco até o uso. A fosfolipase A_2 gentilmente cedida pelo Dr. Isaías Raw, Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, foi purificada pelo método descrito por Rübsamen[10]. As preparações, tanto de veneno crotálico bruto como de fosfolipase A_2, foram preparadas imediatamente antes do uso, em NaCl 0.15M a 1mg/ml. A incorporação de antígeno em adjuvante completo de Freund (ACF) foi realizada, ajuntando, sob agitação, gota a gota, um volume da solução de veneno ou de fosfolipase A_2 a um volume do adjuvante.

Imunização dos Animais: Os animais do Grupo I foram imunizados com veneno crotálico bruto enquanto os animais do Grupo II foram imunizados com fosfolipase A_2.

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; STEPHANO, M. A.; JOSÉ dos SANTOS, M.; DIAS da SILVA, W.; UEDA, C. M. P. M. Produção de anticorpos antiveneno total de *Crotalus durissus terrificus* em cavalos por fosfolipase A_2. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):91-100, 1989.

ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO

Solução A: Emulsão contendo 50% das soluções de veneno crotálico bruto ou de fosfolipase A_2 a 1.0mg/ml em NaCl 0.15M e 50% de ACF.

Solução B: Soluções de veneno crotálico bruto ou de fosfolipase A_2 a 1mg/ml em NaCl 0.15M. As soluções eram preparadas um dia antes da injeção cuidando-se, no caso dos antígenos estarem sendo incorporados ao ACF, de verificar se realmente, tratavam-se de emulsões.

Imunização de base: 10ml da "Solução A" foram injetados, pela via subcutânea, distribuindo-os em dez diferentes pontos do dorso dos cavalos, distanciados um do outro o suficiente para prevenir a confluenciação dos granulomas que viessem a se organizar. Nesta imunização cada animal recebeu 5.0mg de veneno ou de fosfolipase A_2.

1.ª imunização de reforço: Foi realizada cento e vinte quatro dias mais tarde injetando-se, também pela via subcutânea e no dorso dos cavalos, 10ml da "Solução B" ao redor dos granulomas que se organizaram nos locais onde se injetou os antígenos incorporados em ACF. Nesta imunização cada animal recebeu 5.0mg de veneno crotálico bruto ou de fosfolipase A_2.

2.ª, 3.ª, 4.ª e 5.ª imunizações de reforço: A 2.ª imunização de reforço foi realizada 8 dias depois enquanto que as subseqüentes 3.ª, 4.ª e 5.ª imunizações de reforço foram realizadas a intervalos de oito dias entre uma e outra. Nestas quatro últimas imunizações de reforço cada animal recebeu 20mg de veneno crotálico bruto ou de fosfolipase A_2.

Um dia antes do início do processo de imunização e imediatamente antes de cada imunização de reforço, os animais foram sangrados por punção da veia jugular. Após coagulação, os soros eram removidos por centrifugação a 1.000 x G por 30 minutos, divididos em alíquotas de 5ml e armazenados a −20°C até o uso.

O período de imunização foi, portanto, de 148 dias e cada animal recebeu um total de 30mg de veneno crotálico bruto ou de fosfolipase A_2.

MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

a) Método de ELISA: Cem microlitros de veneno total de *Crotalus durissus terrificus* (1 μg/ml) eram depositados nos orifícios das placas de plástico Nuclon (Delta, Holanda) e as placas mantidas a 4°C por uma noite. O conteúdo dos orifícios era removido e substituído por um volume equivalente de tampão fosfato-salina contendo 3% de soro albumina bovina (BSA) e 0.05% de Tween 20 e as placas deixadas em repouso por 3h à temperatura ambiente, condições adequadas ao completo recobrimento da superfície dos orifícios não ocupados pelo veneno. Os orifícios eram lavados por três vezes, por sucção, com tampão fosfato-salina pH 7.5 contendo 0.05% de BSA. Cem microlitros das diferentes diluições dos soros a serem testados eram adicionados aos orifícios e as placas incubadas à temperatura ambiente por 45 minutos. Deixavam-se sempre, como controles, orifícios não tratados ou com veneno ou com o soro nas menores diluições. Após lavagem dos orifícios por três vezes com tampão fosfato-salina, pH 7.5, contendo 0.05% de BSA, adicionava-se a cada orifício 100 μl de ortofenilenediamine (Sigma Co, USA) (1mg/ml) e 4 μl de H_2O_2, incubando-se as placas a temperatura ambiente por 15-20 minutos, a intensidade das reações sendo determinada a 492 nm no espectrofotômetro Titertek, Multis-

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

HIGASHI, H.G., GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A K.; YAMAGUCHI, I.K.; STEPHANO, M. A.; JOSÉ dos SANTOS, M.; DIAS da SILVA, W.; UEDA, C. M. P. M. Produção de anticorpos antiveneno total de *Crotalus durissus terrificus* em cavalos por fosfolipase A_2. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):91-100, 1989.

kan. Os títulos dos soros eram dados pelo inverso das diluições de soro onde ocorriam reações com absorvância igual ou acima de 0,200.

b) *Floculação*: A uma série de tubos contendo 1.0ml das soluções de veneno crotálico bruto nas concentrações de 0.1 a 1.0mg/ml eram adicionados 1.0ml dos soros não diluídos. Após agitação os tubos eram transferidos para banho-maria a 56°C e incubados por 45 minutos. Os títulos dos soros eram dados pela concentração de veneno em mg/ml nos tubos contendo a maior concentração em que havia nítida formação de flóculos com aspecto de nuvem.

c) *Eletroforese em acetato de celulose*: Sobre fitas de acetato de celulose (Cellogel, Itália) previamente embebidas em tampão barbital sódio 0.04M, pH 8.6, eram aplicadas 5 μl de soro. Procedia-se uma separação eletroforética em corrente de 200v por 25 minutos. As fitas eram, então, imersas em solução corante (0.5% de amidoschwarz 10B Merck, 47,5% de metanol, 47,5% de água destilada e 5% de ácido acético glacial) por 8 minutos e diferenciadas na solução descorante (47.5% de metanol, 47.5% de água e 5% de ácido acético). A seguir, as fitas eram desidratadas em metanol absoluto por 30 segundos e depois transferidas para a solução transparentizadora (85% de metanol, 14% de ácido acético glacial e 1% de glicerina) e secadas em estufa a 37°C. Após a transparentização as fitas eram lidas no densitômetro (Tecnow) e as densidades óticas grafadas em papel milimetrado. Por este processo sete bandas foram identificadas e as suas concentrações relativas determinadas: albumina, $\alpha 1'$ $\alpha 2$ $\beta 1$ e $\beta 2$ $\gamma 1$ e $\gamma 2$.

d) *Imunodifusão*: Lâminas de vidro recobertas com gel de agarose a 0,8% em tampão barbital sódio 0.056M, pH 8.6 e contendo conjuntos de sete orifícios com 3mm de diâmetro, sendo um central e seis periféricos circularmente dispostos foram usadas neste método. Depositavam-se amostras de 20 μl das diferentes diluições do soro nos orifícios periféricos e 20 μl da solução de veneno crotálico a 6mg/ml no orifício central. As lâminas eram mantidas em câmara úmida por 24h, lavadas sequencialmente em solução salina e em água destilada para remover completamente as proteínas não precipitadas, secadas em estufa a 37°C e imersas na solução corante (0.2% de azul de Coomassie brilhante G-250, 50% de metanol, 40% água e 10% de ácido acético). Os títulos correspondem ao inverso das maiores diluições dos soros onde as bandas de precipitação eram nítidas à inspeção visual.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto o veneno crotálico bruto obtido de *Crotalus durissus terrificus* contendo crotamina como a fração de fosfolipase A_2 purificada a partir deste veneno são capazes de produzir anticorpos. Estes anticorpos, avaliados por três diferentes métodos, o método imunoenzimático de ELISA, a dupla difusão em gel de agarose e a floculação, reconhecem epitopos presentes no veneno crotálico bruto quer tenham sido induzidos pelo próprio veneno quer pela fosfolipase A_2.

A Tabela I mostra os títulos de anticorpos presentes nas amostras de plasma dos cavalos imunizados com veneno crotálico bruto ou com a fosfolipase A_2 colhidas oito dias depois da última imunização de reforço. Quando os níveis de anticorpos foram determinados pelo método de ELISA apenas o animal M-84 discrepou dos demais apresentando um título de 400

x 10^3 enquanto nos demais quer imunizados com veneno crotálico bruto quer com fosfolipase A_2 os títulos giravam em torno de 32 a 64 x 10^3. Estes resultados, tomados em conjunto, sugerem que o potencial imunogênico tanto da fosfolipase A_2 como do veneno crotálico bruto seria semelhante. Quando, entretanto, os mesmos soros foram analisados pelo método da dupla difusão em gel de agarose, os soros de três animais imunizados com veneno crotálico bruto tinham títulos elevados sendo um de 128 e dois de 256; já os soros dos animais imunizados com fosfolipase A_2 variaram de 8 a 64. Tal discrepância poderia ser explicada pela maior sensibilidade do método de ELISA que é capaz de detectar quantidades de antígeno ou de anticorpo da ordem de μg/ml enquanto que pelo método da dupla difusão em gel de agarose os imunocomplexos somente podem ser visualizados se os reagentes antígeno e anticorpo estiverem na concentração de 2-5 μg/ml *Bier et al.* [1] Já no ensaio de floculação, à exceção dos animais M-84 e M-85, os títulos foram homogêneos: no primeiro caso 1.0ml de soro foi capaz de flocular 1.0mg ou mesmo mais de veneno botrópico bruto enquanto no segundo caso não se observou floculação. É interessante salientar que no soro do animal M-84 houve correspondência entre os títulos de anticorpos revelados pelos métodos de ELISA e de imunodifusão. De qualquer modo,

TABELA I

Título de anticorpos antiveneno de *Crotalus durissus terrificus* em cavalos imunizados com a fração fosfolipase A_2 deste veneno ou com veneno bruto.

Grupo (n.º animal)	Imunização [a]	Título de anticorpos no soro determinado por: (b, c)					
		ELISA		Imunodifusão		Floculação	
		A_{292} 0.200 (1/dil) x 10^3		1(dil) x 1		1(dil) x 1	
Grupo I		A	D	A	D	A	D
M – 84	Veneno crotálico bruto	0	400	0	128	NF	1.0
M – 85		0	32	0	256	NF	NF
C – 334		0	64	0	256	NF	0.4
C – 364		0	32	0	32	NF	0.4
Grupo II							
M – 220	Fosfolipase A_2	0	32	0	8	NF	0.5
M – 381		0	32	0	32	NF	0.2
C – 394		0	64	0	64	NF	0.5
C – 548		0	64	0	32	NF	0.4

a. Imunização de base: 5mg de veneno crotálico bruto contendo crotamina ou de fosfolipase A_2 emulsionados em adjuvante completo de Freund; imunização de reforço realizada 4 meses depois: cinco injeções subcutâneas a intervalos de 8 dias de 5mg do antígeno correspondente dissolvidos em salina.

b. Os valores incluídos na tabela correspondem às titulações feitas nas amostras de soro colhidas 8 dias depois da última injeção de veneno crotálico bruto ou fosfolipase A_2 na imunização de reforço.

c. A e D correspondem, respectivamente, aos valores obtidos nos ensaios realizados nas amostras de soro colhidas imediatamente antes do início da imunização e 8 dias depois da última injeção de antígeno na imunização de reforço.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; STEPHANO, M. A.; JOSÉ dos SANTOS, M.; DIAS da SILVA, W.; UEDA, C. M. P. M. Produção de anticorpos antiveneno total de *Crotalus durissus terrificus* em cavalos por fosfolipase A_2. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):91-100, 1989.

excetuando o animal M-85, nos demais os títulos em anticorpos floculantes se encaixam bem dentro dos limites exigíveis nos soros hiperimunes antiveneno crotálico produzidos para fins terapêuticos.

Os resultados da análise eletroforética desses soros em acetato de celulose acham-se na Figura 1 e na Tabela II. A análise desses resultados revelou: a) consistente e acentuada redução dos valores percentuais da albumina entre as amostras de misturas de soros colhidas após a 6.ª inoculação de reforço e as amostras obtidas antes da imunização de base; b) redução de fração α_1 nas amostras de soro obtidas após a 6.ª inoculação de reforço; c) não houve modificações consistentes da fração α_2 nas amostras de soro após a 6.ª inoculação de reforço; e, d) houve nítido aumento da fração da gamaglobulina decorrente de maior produção das λ_2 globulinas. Essas modificações concordam com os resultados obtidos nos ensaios pelos métodos de ELISA, imunodifusão e floculação.

TABELA II

Distribuição Eletroforética das Proteínas do Plasma de Cavalos Imunizados com Veneno Crotálico Bruto ou com um dos seus componentes, a enzima Fosfolipase A_2

Animal n.º	Proteínas totais (g%)		Distribuição das proteínas plasmáticas na eletroforese (%)											
			Alb		α_1		α_2		β		γ_1		γ_2	
	1.ºS	6.ºS	1.ºS	6.ºS	1.ºS	6.ºS	1.ºS	6.ºS	1.ºS	6.ºS	1.ºS	6.ºS	1.ºS	6.ºS
M – 84	11.0	12.5	26.9	24.8	10.6	5.1	10.7	8.9	27.3	20.2	14.3	13.1	10.2	27.9
M – 85	11.2	10.4	33.9	28.9	7.4	5.4	11.7	12.0	24.4	17.6	12.5	9.7	9.6	27.4
C – 334	10.6	10.6	44.0	28.1	10.1	2.8	13.5	15.0	17.9	14.2	10.6	11.2	3.9	28.7
C – 364	9.9	9.5	39.8	28.5	7.0	5.3	11.7	19.5	21.0	18.5	9.2	10.3	11.3	17.9
M – 220	10.4	9.5	49.5	28.3	6.9	4.4	11.5	14.0	19.2	23.5	9.3	9.7	3.6	20.1
M – 381	11.0	10.4	33.2	19.3	7.1	3.1	13.1	12.8	22.8	30.5	11.7	11.9	12.1	22.4
C – 394	9.9	13.2	36.3	20.1	2.8	3.1	11.9	11.3	17.1	19.3	10.2	14.3	21.7	31.9
C – 548	10.6	11.5	38.5	19.3	11.5	4.4	12.2	15.7	15.9	19.7	11.0	15.2	10.9	25.7

Os resultados apresentados neste trabalho são compatíveis com outros já existentes na bibliografia especializada mostrando que a fosfolipase A_2, conquanto seja praticamente atóxica, preserva, quase integralmente, a capacidade imunogênica do veneno crotálico bruto. Esta propriedade da fosfolipase A_2 indica-a como o imunógeno alternativo nas imunizações de animais para a obtenção de soros antiveneno crotálico: a sua baixa toxidez permitiria a injeção de doses maiores garantindo assim adequada resposta imune primária. A ausência de possíveis grupamentos tóxicos para os quais obviamente não seriam produzidos anticorpos neutralizantes se somente a fosfolipase A_2 fosse utilizada como antígeno, seria compensada substituindo-se a fosfolipase A_2, nas imunizações de reforço, por veneno crotálico bruto contendo crotamina[8]. Permitiria, também, a formação de anticorpos anticrotamina, completando-se as exigências para um soro anticrotálico ideal. Tal soro deveria conter anticorpos neutralizantes para todos os grupamentos toxóforos presentes no veneno integral.

Assim, os resultados apresentados neste trabalho indicam que nos esquemas de imunização de cavalos para a produção de soros antiveneno crotálico a melhor estratégia seria fazer-se uma boa imunização de base

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; STEPHANO, M. A.; JOSÈ dos SANTOS, M.; DIAS da SILVA, W.; UEDA, C. M. P. M. Produção de anticorpos antiveneno total de *Crotalus durissus terrificus* em cavalos por fosfolipase A_2. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):91-100, 1989.

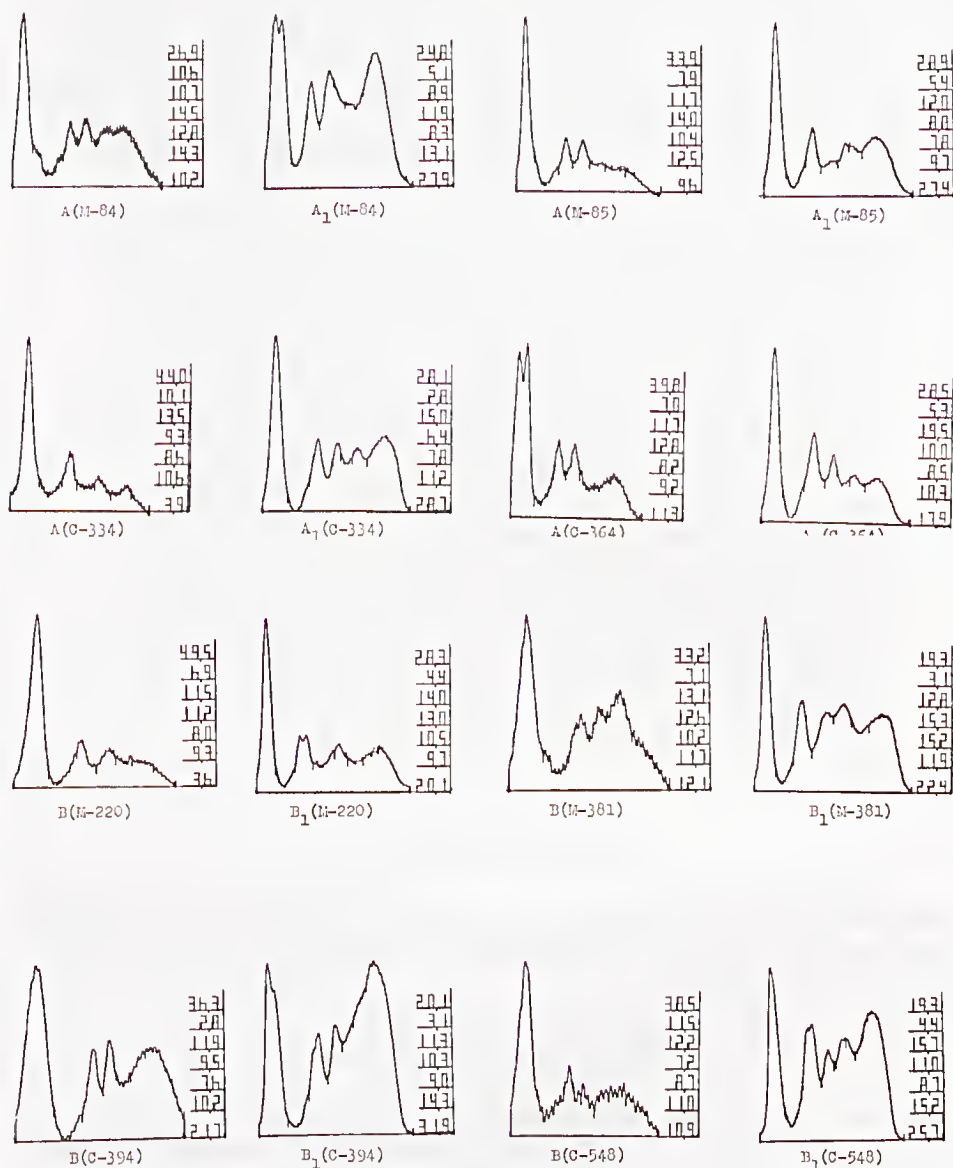



Figura 1: Perfis eletroforéticos dos soros de cavalos imunizados com veneno crotálico bruto contendo crotamina painéis A(M-84), A_1(M-84), A(M-85) A_1(M-85), A(C-334), A_1(C-334), A(C-364) e A_1(C-364) ou com fosfolipase A_2 isolada deste veneno painéis B(M-220), B_1(M-220), B(M-381), B_1(M-381), B(C-394), B_1(C-394), B(C-548) e B_1(C-548).
Os símbolos sem e com o subscrito (1) colocado ao lado de A ou de B, designam, respectivamente, as amostras de soro colhidas imediatamente antes da imunização ou uma semana depois da última imunização de reforço. Os números à direita de cada painel indicam, de cima para baixo, os valores percentuais para albumina e para as globulinas α_1, α_2, β_1, β_2, γ_1 e γ_2 5µl de soro eram depositados sobre fitas de acetato de celulose e a eletroforese realizada usando tampão barbital de sódio 0.04M, pH 8.6 em corrente elétrica de 200V por 25min.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

com a fosfolipase A_2 incorporada ao ACF e as imunizações de reforço com veneno crotálico bruto. A imunização de base feita dessa maneira minimizaria os riscos de mortes dos cavalos mais sensíveis aos efeitos letais do veneno crotálico no início do processo de imunização. A produção inicial de anticorpos permitiria a injeção do veneno crotálico bruto, nas imunizações de reforço, sob condições mais seguras garantindo a formação de anticorpos específicos para os grupos toxóforos relevantes, presentes no veneno crotálico.

ABSTRACT: Phospholipase A_2, purified from crotoxin obtained from *Crotalus durissus terrificus* venom or whole venom were used to immunize horses or burros. The primary immune response was elicited by injectecting the animals with the antigens (5mg) incorporated in Freund's complet adjuvant. Four months later the animals were reimmunized with the antigens alone (5mg) for six times a week apart. Samples of blood were collected just before each injection and the sera used to determine the antibodis against whole venom by the floculation, immunodifusion, and ELISA methods. The animals injected either with phospholipase A_2 or with the crude venom produced antibodies against the whole *Crotalus durissus terrificus* venom with almost the same titers. These sera when analyzed by electrophoresis in cellogel showed a consistent reduction of the albumin and a correspondent increase in the globulin fractions, mostly of the γ_2 globulins; and the α_1 globulins became reduced whereas the α_2 globulins did not show appreciable changes. These results show that phospholipase A_2 is able to mount an effective primary immune response in horses or burros and indicate that it could be incorporated in the immunization schedule to produce sera anti-*Crotalus durissus terrificus* venom for therapeutic purpouses.
KEYWORDS: Phospholipase A_2. Crotalic venom. Antisera. Snake venoms.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários e servidores do Setor de Imunização e Concentração e Fracionamento de Soros pela colaboração prestada no decorrer do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIER, O.G.; DIAS da SILVA, W.; GOTZE, O.; MOTA, I. Antigen — antibody interaction. In ———— *Fundamentals of immunology*. 2. ed. Berlin, Springer-Verlag, 1986. p. 179.
2. BON, C. & JENG, T.W. Crotoxin; a possible mechanism of action. *Adv. Cytopharmac., 3*:231, 1979.
3. HABERMANN, E. & BREITHAUP, H. Mini — review. The crotoxin complex; an example of biochemical and pharmacological protein complementation. *Toxicon, 16*: 19, 1978.
4. HANASHIRO, M. A.; DA SILVA, M. H.; BIER, O. G. Neutralization of crotoxin and crude venom by rabbit antiserum to Crotalus phospholipase A_2. *Immunochemistry, 15*: 745, 1978.
5. HENDON, R. A. & FRANKEL — CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. *Proc. nat. Acad. Sci., 68:* 1560, 1971.
6. HORST, J.; HENDON, R.A.; FRANKEL — CONRAT, H. The active components of crotoxin. *Biochem. biophys. Res. Commun., 46:* 1042, 1972.
7. JENG, T.W.; HENDON, R.A.; FRANKEL — CONRAT, H. Search for relationships among the hemolytic, phospholipolytic and neurotoxic activities of snake venoms. *Proc. nat. Acad. Sci., 75:* 600, 1978.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; STEPHANO, M. A.; JOSÉ dos SANTOS, M.; DIAS da SILVA, W.; UEDA, C. M. P. M. Produção de anticorpos antiveneno total de *Crotalus durissus terrificus* em cavalos por fosfolipase A_2. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):91-100, 1989.

8. MOURA GONÇALVES, J. & VIEIRA, L. G. Estudos, sobre venenos de serpentes brasileiras. I — Análise eletroforética. *An. Acad. bras. Ciênc., 22:* 141, 1950.
9. PRADO — FRANCESCHI, J.; TAVARES, D.Q.; HERTEL, R.; ARAÚJO, A. L. de. Effects of convulxin, a toxin from rattlesnake venom, on platelets and leukocytes of anesthetized rabbits. *Toxicon, 19:* 661, 1981.
10. RUBSAMEN, K., BREITHAUPT, H., HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak., 270:* 274, 1971.
11. SANTOS, M.C. dos; DINIZ, C.R.; WHITAKER, M.A. P.; DIAS da SILVA, W. Phospholipase A_2 injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon, 26*(2): 207 — 213, 1988.
12. SILVA, M.H. da & BIER, O.G. Titration of antiserum to South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by inhibition of phospholipase A_2 activity. *Toxicon, 20:* 563, 1982.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
51(3):101-106, 1989

CHEMISTRY OF THE BRAZILIAN LABIATAE*. TERPENOIDS CONSTITUENTS OF *LEPECHINIA SPECIOSA* (St. Hil.) Epling

Raymond ZELNIK**
Flávia MARTELLINI-LANDSHOFF**
Ema RABENHORST**

ABSTRACT: Two terpenoids have been isolated from the aerial parts of *Lepechinia speciosa* (St. Hil.) Epling and identified as carnosol and ursolic acid by spectroscopical methods.
KEYWORDS: *Lepechinia speciosa* (St. Hil.) Epling; Labiatae; terpenoids; carnosol; ursolic acid.

INTRODUCTION

The Labiatae constitute a family of plants widely distributed over all the continents and highly appreciated for their medicinal and culinary properties. A recent example is the description of forskolin, a labdane-type diterpene isolated from the Indian *Coleus forskohlii* Briq.[2] and useful in the treatment of cardiac insufficiency, glaucoma and asthma[11]. In Brazil, although 34 genus and 350 species of Labiatae have been recorded[1], only one representative of the genus LEPECHINIA, namely *Lepechinia speciosa* (St. Hil.) Epling, has so far been catalogued as endemic in the mountainous regions of Itatiaia, State of Rio de Janeiro[3] (see map in Fig. 1). .

---

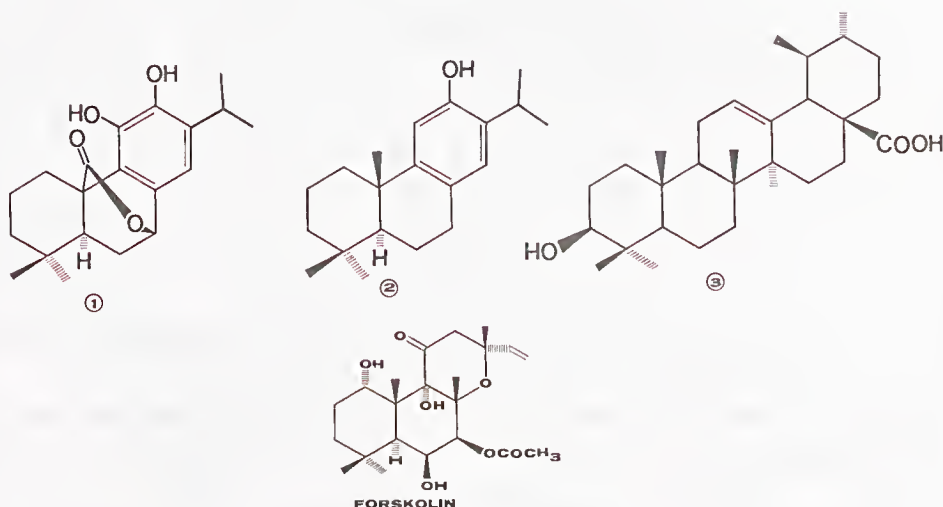
* Part 7 in a series "Chemistry of the Brazilian Labiatae".
For part 6, see MATIDA, A. K. *et al.*, *Rev. bras. Farmacognosia*, 1(2):183, 1986.

** Serviço de Química Orgânica.
Instituto Butantan. CP 65 — 01051 — São Paulo — SP — Brasil.
Recebido para publicação em 22-3-1989 e aceito em 6-6-1989.

Fig. 1 — Distribution of the genus *Lepechinia* in South and Central America according to Brade[3].

ZELNIK, R; MARTELLINI-LANDSHOFF, F.; RABENHORST, E. Chemistry of the brazilian Labiatae. Terpenoids constituents of *Lepechinia speciosa* (St. Hil.) Epling. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):101-106, 1989.

In the course of a continuous phytochemical survey of the Brazilian Labiatae, we have examined a sample of *Lepechinia speciosa* and we now report the isolation of two terpenoids, carnosol 1 and ursolic acid 3.

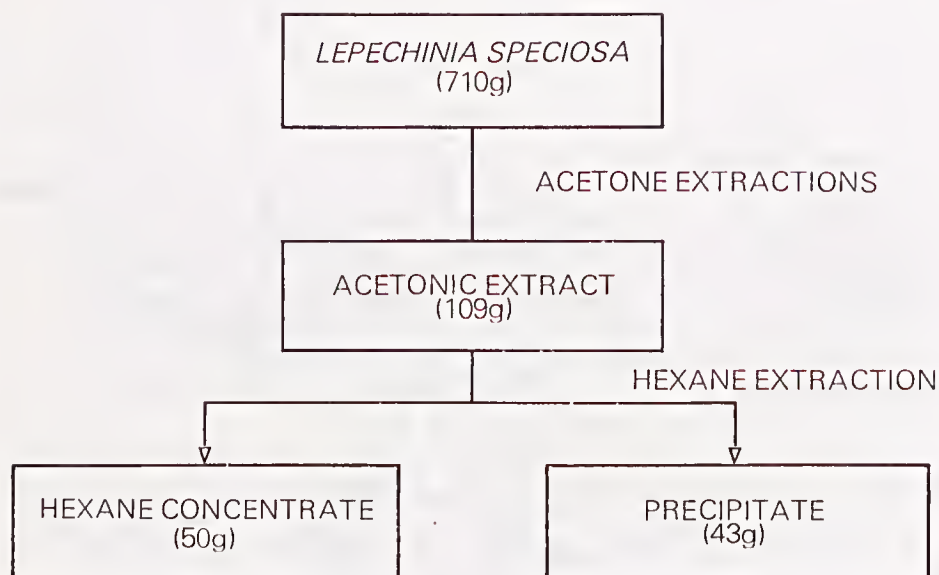
FORSKOLIN

MATERIAL AND METHODS

The aerial parts of *Lepechinia speciosa*, a small shrub growing above 2400m, were collected in the mountainous regions of Itatiaia. A voucher specimen is deposited in the Herbarium of the Institute of Biosciences, University of São Paulo. Melting points were determined on a Kofler-Reichert hot-stage microscope and are uncorrected. Infra-red spectra were recorded for KBr discs, using a Perkin-Elmer 737 instrument. Ultra-violet spectra were performed on a Varian 634-S spectrophotometer. ^{1}H NMR spectra were recorded at 60 MHz on a Varian T-60 apparatus, in d-DMSO solutions and TMS as internal standard, MS were obtained by probe inlet at 70 eV from a VG Micromass MM 12F instrument. Microanalyses are from the Institute of Chemistry, University of São Paulo. Column chromatographies were carried out with Silica gel (Merck 0.05-0.20mm) and thin-layer chromatographies on plates coated with Silica H (Merck), using iodine vapours for revelation.

RESULTS AND DISCUSSION

The air-dried leaves (710 g) were ground and refluxed with 6 portions of acetone (4 l each). Upon evaporation under reduced pressure, the combined acetonic extracts were treated with hexane (0,5 l), yielding a greenish precipitate (43 g). The hexane filtrate was then concentrated to a viscous residue (50 g). Table 1 depicts the overall extraction procedure.

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

TABLE 1.

The final viscous residue was triturated with a small volume of hexane to give a whitish precipitate (1.4 g) which was chromatographed on Silica gel column. Elutions from hexane-ethyl acetate 1:3 and 1:4 afforded 0.58 g (0.08% by dry weight) of a compound named LS-1, which crystallized from MeOH-H_2O as colourless plates, m.p. 202-204°. Its molecular formula $C_{20}H_{26}O_4$ was established from elemental analyses and low resolution MS (M^+ m/z 330). In the IR spectrum, absorption bands at 3500 and 3300 cm^{-1} indicated the presence of two hydroxyl groups and at 1720 cm^{-1} the existence of a carbonyl group whereas sharp bands of medium intensities in the region of 1500-800 cm^{-1} characterized an aromatic-type structure. In the UV spectrum, absorption at λ_{max}^{EtOH} 284 nm shifted to 304 nm upon NaOH addition, a fact consistent with a catechol or a resorcinol moiety[7]. In the ^1H NMR spectrum, signals for four methyl groups could be observed, two of which are at the same position (δ 0.81 ppm) and two appear as a 7 Hz doublet centered at δ 1.15 ppm, indicating an isopropyl group. A signal at δ 6.62 ppm (1 H, s) disclosed the presence of an aromatic proton.

Treatment of compound LS-1 with acetic anhydride and pyridine afforded an acetylated derivative as a gum. In the IR spectrum, its carbonyl absorptions at 1780 and 1760 cm^{-1} fall in the range for γ and δ lactones and overlaps with that of an acetate[9]. Its ^1H NMR spectrum displayed a signal at δ 2.21 ppm (6 H) for two acetyl groups.

From these results, an aromatic abietane skeleton, related to a ferruginol-type structure 2 and retaining a lactone ring[4], was attained for compound LS-1. This view was strenghtened in the MS spectrum by the intense peak at m/z 286, corresponding to the loss of a CO_2 fragment from the molecular ion, attributed to the elimination of a C-10 substituent in diterpenes[5] and strongly suggesting that the remaining methyle of the abietane nucleus is part of the lactone ring.

Reviewing the spectroscopic data of various abietane diterpenes isolated from the Labiatae, those of carnosol[6] configurate the same patterns as those discussed hitherto for compound LS-1. The identity of their molecular structures was then confirmed when the IR and ^1H NMR spectra of LS-1 were superimposed with those of an authentic sample of carnosol[13].

Further investigation of the precipitate from the acetonic extract was subsequently undertaken. A portion of 2.5 g was chromatographed on a Silica gel column and elutions from hexane-ethyl acetate 5:1 and 3:1 furnished a compound which crystallized from acetone-hexane as colourless needles, m.p. 268-274.°, yield 0.6 g. Its IR spectrum was reminiscent of that of ursolic acid 3, a triterpenic acid widely distributed in Brazilian Labiatae[8,12]. Consequently a direct comparison with the IR spectrum of an authentic sample of ursolic acid settled such identity. This finding parallels that of the constituents of *Lepechinia chamaedryoides*, a species native to Chile and shown to produce ursolic acid[10].

RESUMO: Dois terpenóides foram isolados das folhas de *Lepechinia speciosa* (St. Hil.) Epling e identificados por métodos espectrométricos como sendo o carnosol e o ácido ursólico.
UNITERMOS: *Lepechinia speciosa* (St. Hil.) Epling.* Labiatae. Terpenos. Carnosol. Ácido ursólico.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their thanks to Professor Sylvio Panizza, Department of Botany, University of São Paulo, for the classification of the botanical material and to Professor Alphonse Kelecom, Universidade Federal Fluminense, Niteroi (RJ) for helpful discussions. Thanks are also due to Mr. Eduardo Miguez, NPPN, Universidade Federal do Rio de Janeiro, for the Mass spectra. One of us (FML) is grateful to the Institute Butantan for a post-graduate research fellowship.

REFERENCES

1. ANGELY, J. *Flora analítica e fitogeográfica do Estado de São Paulo.* São Paulo, Phyton, 1970. V.4.
2. BHAT, S.V.; BAJWA, B.S.; DORNAUER, H.; SOUZA, N.J. de; FEHLHABER, H.W. Structures and stereochemistry of new labdane diterpenoids from *Coleus forskohlii* Briq. *Tetrahedron Letters*, : 1689, 1977.
3. BRADE, A.C. *A flora do Parque Nacional do Itatiaia.* Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura/Serviço Florestal, 1956. Bol. n.° 5.
4. CAMPBELL, W.P. & TODD, D. The structure and configuration of resin acids. Podocarpic acid and ferruginol. *J. Amer. Chem. Soc., 64*: 928, 1942.
5. ENZELL, C.R. & WAHLBERG, I. Mass spectrometric studies of diterpenes. *Acta Chem. Scand., 23*: 871, 1969.
6. INATANI, R.; NAKATANI, N.; FUWA, H.; SETO, H. Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agric. Biol.* Chem., *46*: 1661, 1982 and references cited therein.
7. KELECOM, A. 6 β-hydroxy-Carnosol. A new minor diterpene from the false boldo, *Coleus barbatus* Bentham (Labiatae). *Quim. Nova, 6*: 117, 1983, and references cited therein.
8. MATIDA, A.K.; ZELNIK, R.; PANIZZA, S. Presence of ursolic acid and 2 α — hydroxy-ursolic acid in *Hyptis umbrosa* Salzman and *Eriope crassipes* Bentham. *Rev. Bras. Farmacognosia, 1*(2): 183, 1986.
9. NAKATANI, N.; INATANI, R. A new diterpene lactone, rosmadial from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agric. Biol. Chem.*, 47: 353, 1983.

ZELNIK, R; MARTELLINI-LANDSHOFF, F.; RABENHORST, E. Chemistry of the brazilian Labiatae. Terpenoids constituents of *Lepechinia speciosa* (St. Hil.) Epling. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):101-106, 1989.

10. SILVA, M. Triterpenic constituents of *Lepechinia chamaedryoides, J. Pharm. Sci., 57*: 864, 1968.
11. SOUZA, N.J. de; Forskolin: an example of innovative drug research on natural products. In: Harms, A.F. *Innovative approaches in drug research*. Amsterdam, Elsevier, 1986. p. 191.
12. ZELNIK, R.; MATIDA, A.K.; PANIZZA, S. Chemistry of the brazilian Labiatae. The occurrence of ursolic acid in *Peltodon radicans* Pohl. *Mem. Inst. Butantan, 42/43:* 357, 1978/79.
13. The authors are indebted to Professor A. Kelecom, Universidade Federal Fluminense, Niteroi (RJ) for kindly providing a sample of carnosol.

Mem. Inst. Butantan
51(3): 107-115,1989

VENENOS BOTRÓPICOS PRÉ-TRATADOS COM INIBIDORES ATIVOS PARA OS SÍTIOS ENZIMÁTICOS DE PROTEASES E COM SUBSTÂNCIA QUELANTE PRESERVAM SEU PODER IMUNOGÊNICO.

Hisako Gondo HIGASHI*
Rosalvo GUIDOLIN*
Amélia Keiko NISHIKAWA*
Ivone Kazuko YAMAGUCHI*
Maria Laura S. Rodrigues LIMA*
Josefina Farina MORAIS*
Wilmar DIAS da SILVA**

RESUMO: Estudou-se, no presente trabalho, o efeito de inibidores específicos para o centro ativo de proteases, o p-nitrofenil-p' -guanidino benzoato (NPGB) e o fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF) ou do quelante ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) sobre as propriedades imunogênicas dos componentes dos venenos botrópicos. A mistura usada como antígeno continha 50% de veneno de *B. jararaca* e 50% de uma mistura em partes iguais, dos venenos de *B. alternatus*, *B.cotiara*, *B.jararacuçu*, *B. neuwiedi*, *B. moojeni* e *B. pradoi* (MVB). Cinco cavalos, pesando 400-450kg foram imunizados com essa mistura pré-tratada com 5μM de NPGB, 5 μM de PMSF e 10 μM de EDTA, (MVB-I) e cinco cavalos do mesmo porte foram imunizados com a mistura "in natura" (MVB). A resposta primária foi induzida injetando-se 5 mg das misturas MVB—I ou MVB incorporadas em adjuvante completo de Freund (ACF). Quatro meses depois, os animais receberam cinco imunizações de reforço, cada uma com 10 mg de MVB-I ou MVB, em NaCl a 0,15M, a intervalos de 8 dias entre as imunizações. Os resultados permitem concluir: a) que os venenos botrópicos pré-tratados com esses inibidores de proteases deveriam ser usados como antígenos em substituição ao veneno não tratado; e, b) que o esquema de imunização de cavalos para a produção de soros antivenenos poderia constar de uma imunização de base com 5 mg do veneno incorporado em ACF seguida, 3-4 meses depois, por duas imunizações de reforço, cada uma com 10 mg de veneno em NaCl 0,15 M a intervalos de 8 dias, procedendo-se à sangria 8 dias depois.

UNITERMOS: *Bothrops*. Venenos botrópicos. Enzimas proteolíticas.

---

* Seção de Concentração e Fracionamento de Soros.
** Laboratório Especial de Imunoquímica
Instituto Butantan. C.P. 65 — 01051 — São Paulo-SP-Brasil
Recebido para publicação em 8.5.1989 e aceito em 27.6.1989.

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F.; DIAS da SILVA, W. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):107-115, 1989.

INTRODUÇÃO

O veneno das serpentes do gênero *Bothrops* contêm numerosas proteases entre as quais se incluem endopeptidase e proteases de baixa especificidade, hidrolases de ésteres de arginina, ativadores de protrombina, ativadores do Fator X e cininogenases (Deutsch e Diniz,[3]; Iwanaga e Suzuki,[5]; Mebs,[7]; Kocholaty *et al.*[6].)

Essas enzimas, quer por ação direta sobre tecidos e vasos quer liberando peptídios de proteínas teciduais ou plasmáticas, podem desempenhar papel importante na mediação das alterações subseqüentes à introdução dos venenos nos tecidos: aumento da permeabilidade vascular seguida de edema; formação de coágulos e obstrução vascular; ruptura de estruturas das paredes dos vasos e hemorragia; formação local de peptídios potencialmente capazes de promover efeitos locais e sistêmicos como a bradicinina e as anafilatoxinas (Rocha e Silva, *et al.*[9]; Slotta,[10]; Dias da Silva, *et al.*[4])

A bem documentada ação de algumas dessas enzimas proteolíticas sobre os tecidos animais e sobre proteínas plasmáticas implicam-nas como agentes potencialmente responsáveis por apreciável parte das lesões locais e sistêmicas que ocorrem, quer durante os envenamentos por acidentes ofídicos, quer incidentalmente nos locais das injeção dos animais que estão sendo utilizados para a produção de soros antiofídicos.

Dispõe-se, hoje, de inibidores específicos de baixo peso molecular capazes de inibir irreversivelmente os centros ativos de enzimas proteolíticas sem produzir apreciáveis modificações conformacionais na sua estrutura molecular ou de quelar íons fundamentais para a expressão da atividade enzimática dessas enzimas. Entre os primeiros enquadram-se o "p - nitrofenil-p'-guanidino-benzoato, (NPGB)" e o "fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF)" e entre os segundos o ácido etileno-diamine-tetraacético (EDTA).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que venenos botrópicos tratados com dois inibidores de baixo peso molecular ativos sobre o sítio enzimático de enzimas proteolíticas, o "p - nitrofenil - p' - guanidino benzoato" (NPGB) e o fenil - metil - sulfonil fluoreto (PMSF) e o agente quelante para cations bivalentes, o ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA), induzem a produção de antisoros, em cavalos, com títulos semelhantes aos antisoros produzidos pelos mesmos venenos não submetidos ao tratamento com estes inibidores. Observou-se além disso, que as lesões usualmente observadas no local da injeção dos venenos eram menos intensas, ou mesmo ausentes, quando os venenos eram pré-tratados com os inibidores.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados dez eqüideos adultos sendo seis muares (M) e quatro cavalos (C) que haviam sido utilizados para a produção de soro anti-rábico registrados com os números M-89, M-90, M-130, M-550, M-594, M-650, C-375, C-385, C-588 e C-590.

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F.; DIAS da SILVA, W. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):107-115, 1989.

Antígenos: Utilizou-se, como antígeno, a mistura de venenos botrópicos usualmente empregada no Instituto Butantan para a produção de soro antibotrópico. Esta mistura foi preparada, adicionando-se a um volume de solução de veneno de *B. jararaca* a 5 mg/ml em NaCl a 0,15M igual volume de uma solução a 5 mg/ml, em NaCl a 0,15M, contendo partes iguais dos venenos de *B. alternatus*, *B. cotiara*. *B. jararacuçu*, *B. moojeni*, *B.* neuwiedi e *B. pradoi*. Esta mistura foi dividida em duas porções: uma, "in natura" designada MVB e a outra contendo 5 μM de NPGB, 5 μM de PMSF e 10 μM de EDTA, designada MVB-I. As duas misturas foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, divididas em alíquotas e congeladas à -20°C. As soluções MVB-I foram diluídas em NaCl a 0,15 M para 1 mg/ml de veneno. Para a imunização de base 5 ml de cada solução de veneno foram emulsionados com igual volume de adjuvante completo de Freund (ACF). Para as imunizações de reforço foi usada a solução de veneno diluído em NaCl a 0,15M a 1 mg/ml.

Imunizações dos animais: Os animais M-89, M-90, M-130, C-375, e C-385 foram imunizados com a mistura de venenos designada MVB e os animais M-550, M-594, M-650, C-588 e C-590 foram imunizados com a mistura MVB-I.

Imunização de base: Dez mililitros das emulsões MVB-AFC ou MVB-I-AFC foram injetados, pela via subcutânea, em diferentes pontos do dorso do animal distanciados um do outro o sufuciente para que não ocorresse confluenciação dos granulomas que viessem a se desenvolver.

Imunização de reforço: Quatro meses depois os animais foram injetados com 10 ml das soluções de venenos botrópicos MVB ou MVB-I a 1 mg/ml em NaCl 0,15M, pela via subcutânea, ao redor dos granulomas. Esta injeção foi repetida por mais quatro vezes a intervalos de 8 dias entre as inoculações.

Amostras de sangue foram obtidas antes de cada injeção de veneno e os soros obtidos foram aliquotados e armazenados a -20°C até o uso. O período de imunização foi de 160 dias e cada animal recebeu um total de 60 mg de veneno.

Método de ELISA Theakston e col. [11]. Cem microlitros da solução da mistura de venenos botrópicos contendo veneno das sete espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, (conforme indicado no item "Antígenos"), na concentração 1 μg/ml, foram adicionados aos poços em forma de *U* das placas de plástico marca "Nuclon" (Delta, Dinamarca). As placas foram mantidas a 4.°C durante a noite, tempo suficiente para que se realizasse a adsorção do veneno à superfície dos poços. A seguir, as placas foram saturadas com uma solução de albumina (BSA) a 3%, contendo em 0,05% de Tween 20 em NaCl a 0,15M e deixando-as em repouso, à temperatura ambiente, por 3h. Após três lavagens com uma solução de PBS 100mM pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20, a cada poço adicionou-se 100μl dos soros de equídeos hiperimunizados com veneno botrópicos nas diluições de 1/100 a 1/12.000, deixando as placas em repouso por 45min. à temperatura ambiente. Após lavagem seguindo a metodologia descrita acima, 100 μl de soro de coelho anti imunoglolinas de cavalo conjugado com peroxidase (Cappel, Cochaville, USA) foram adicionados aos poços e as placas deixa-

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F.; DIAS da SILVA, W Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):107-115, 1989.

das em repouso por 45 min. à temperatura ambiente. Após lavagem pelo mesmo método descrito acima, 100 μl de ortho-fenildiamina (Sigma Co. USA) na concentração de 1 mg/ml e 0,04μl de H_2 O_2 foram adicionados aos poços e as placas mantidas à temperatura ambiente por 15-20 minutos, tempo suficiente para o desenvolvimento da cor. Como controles, em cada placa, em um grupo de poços omitiu-se a adição da solução de veneno e em outro omitiu-se a adição de soros de cavalos hiperimunizados. A intensidade da cor desenvolvida era determinada espectrofotometricamente a 492 nm.

Dupla-Difusão em Gel de Agarose Ouchterlony[8]. Placas de vidro de 4cm x 19cm foram recobertas com uma camada uniforme de gel de agarose (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) a 0,8% em tampão barbital sódio, pH 8,6, 0,056 M. Em cada placa foram feitos conjuntos de orifícios com 3mm de diâmetro, havendo em cada conjunto um orifício central e seis orifícios periféricos circularmente dispostos e distanciados 4mm um do outro. Vinte microlitros da solução de veneno a 1 mg/ml, em NaCl a 0,15M, foram depositados no orifício central e iguais quantidades de soro de cavalo antiveneno botrópico em diferentes diluições, nos orifícios periféricos. As placas, depois de transferidas para câmaras úmidas, foram deixadas em repouso por 24h à temperatura ambiente. A seguir, as placas foram lavadas sucessivamente em NaCl a 0,15M por 24h e em água destilada por 24h, secadas na estufa a 37°C e imersas em uma solução corante (0,2% de azul de Coomassie, 45% de metanol, 45% de água e 10% de ácido acético glacial) por 5min e descoradas até fundo transparente na solução descorante (45% de metanol, 45% de água e 10% de ácido acético). Depois de secadas em estufa a 37°C as bandas de precipitação foram identificadas e o título dos soros imunes foram avaliados pela última diluição do soro que ainda fornecia bandas de precipitação visíveis.

Eletroforese em acetato de celulose. Amostras de 5 μl de soro de cavalos hiperimunizados com venenos botrópicos obtidas um dia antes do início do processo de imunização e oito dias após a última imunização de reforço foram aplicadas sobre fitas de acetato de celulose pré-embebidas em tampão veronal de sódio, pH 8.6, 0,04M e submetidas a uma eletroforese a 200V por 25 minutos; logo a seguir, as fitas de acetato de celulose foram imersas na solução corante (0,5% de amido-Schwars IOB em uma solução com 47,5% de metanol, 47,5% de água e 5% de ácido acético glacial) por 8min. e transferidas para a solução diferenciadora (47,5% de metanol, 47,5% de água e 5% de ácido acético glacial). A seguir, as fitas foram imersas na solução transparentizadora (85% de metanol, 14% de ácido acético glacial e 1% de glicerol) e secadas na estufa a 37%C. A absorvância foi determinada no densitômetro.

Neutralização da atividade letal dos venenos botrópicos Vital Brazil[2]. A uma série de amostras de 1,0ml de soro de cavalo antiveneno botrópico, não diluído, adicionou-se 1.0ml de NaCl a 0,15M contendo diferentes quantidades da mistura de venenos botrópicos. Após incubação das misturas à temperatura ambiente por 1h, 2,0ml de cada mistura foram injetados intravenosamente em pombos adultos pesando 250g. O título neutralizante do soro foi considerado como sendo a maior quantidade de veneno cuja atividade letal foi neutralizada por 1,0ml do soro não diluído.

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F.; DIAS da SILVA, W. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):107-115, 1989.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Anticorpos antiveneno botrópico estavam ausentes nas amostras de plasma colhidas imediatamente antes do início da imunização dos cavalos. Após a imunização de base já havia anticorpos circulantes com títulos variáveis de 8 a 3.2×10^3 no ensaio pelo método de ELISA ou de 1,6 a 3.2×10^1 no ensaio pelo método da dupla-difusão em gel de agarose. Após a 1.ª imunização de reforço houve brusca e acentuada ascensão nos títulos de anticorpos detectáveis pelo método de ELISA passando para 128 a 512×10^3, permanecendo estável ao redor desses valores mesmo após a 5.ª e última imunização de reforço. Todavia, no ensaio pelo método da dupla-difusão em gel de agarose não houve alterações apreciáveis em relação aos títulos obtidos nas amostras de plasma colhidas após a imunização de base (Tabelas 1 e 2).

TABELA I

Titulação de anticorpos pelo micrométodo imunoenzimático-ELISA antiveneno botrópico em cavalos imunizados com venenos botrópicos "in natura" ou pré-tratados com inibidores enzimáticos de baixo peso molecular ativos sobre o centro ativo de enzimas proteolíticas.

Mistura* de Venenos Botrópicos	Animal n.°	Anticorpos antivenenos botrópicos (**) (***) (10^3)					
		Imunização de base	Imunização de reforço				
			1.ª dose	2.ª dose	3.ª dose	4.ª dose	5.ª dose
MVB*	89	16	256	200	200	400	200
	90	8	128	50	50	50	100
	130	16	256	200	200	400	400
	375	8	128	200	400	200	200
	385	16	512	200	400	400	200
MVB-I*	550	16	512	200	400	100	200
	594	8	128	200	200	100	—
	650	32	256	400	400	200	100
	588	32	256	200	200	100	100
	590	16	512	400	200	100	200

* MVB: mistura de venenos botrópicos contendo um volume de uma solução de veneno de *B.jararaca* a 5,0mg/ml em NaCl 0.15M e um volume de uma solução de venenos de *B.alternatus, B.cotiara, B.jararacussu, B.moojeni, B.neuwiedi* e *B.pradoi* a 5.0mg/ml contendo quantidades iguais de cada um destes venenos.

* MVB-I — A solução MVB pré-incubada com 5 μM de p-Nitrofenil-p'guanidino benzoato (NPGB), 5 μM de fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF) e 10 μM de ácido etileno-diamino tetracético (EDTA) a 32°, 30 min.

** Última diluição dando reação nitidamente positiva ($\times 10^3$)

*** As amostras de soro colhidas imediatamente antes da imunização de base não deram reações positivas.

TABELA 2

Titulação de anticorpos pelo método de dupla-difusão em gel de agarose antiveneno botrópico em cavalos imunizados com venenos botrópicos "in natura" ou pré-tratados com inibidores enzimáticos de baixo peso molecular ativos sobre o centro ativo de enzimas proteolíticas.

Mistura* de Venenos Botrópicos	Animal n.º	Anticorpos antivenenos botrópicos (**)					
		Imunização de base	Imunização de reforço				
			1.ª dose	2.ª dose	3.ª dose	4.ª dose	5.ª dose
MVB*	89	16	16	16	≥32	16	≥32
	90	≥32	4	≥32	≥32	≥32	≥32
	130	16	32	≥32	16	16	28
	375	16	8	≥32	8	16	32
	385	16	8	≥32	≥32	16	16
MVB-I*	550	16	4	≥32	≥32	16	32
	594	16	16	≥32	≥32	16	8
	650	16	32	≥32	≥32	16	16
	588	16	16	≥32	≥32	16	–
	590	16	16	16	8	16	≥32

* MVB: mistura de venenos botrópicos contendo um volume de uma solução de veneno de *B.jararaca* a 5,0mg/ml em NaCl 0.15M e um volume de uma solução de venenos de *B.alternatus, B.cotiara, B.jararacussu, B.moojeni, B.neuwiedi* e *B.pradoi* a 5.0mg/ml contendo quantidades iguais de cada um destes venenos.

* MVB-I A solução MVB pré-incubada com 5 μM de p-Nitrofenil-p'-guanidino benzoato (NPGB), 5μM de fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF) e 10 μM de ácido etileno-diamino tetracético (EDTA) a 32°, 30 min.

**Todos morreram com um minuto após inoculação.

A enorme diferença entre os títulos de anticorpos detectáveis pelos métodos de ELISA e pela dupla-difusão em gel agarose poderia ser explicada pela também notável diferença entre os limites de sensibilidade dos dois métodos: os métodos imunoenzimáticos podem detectar anticorpos em quantidades da ordem de μg-pg enquanto no método de dupla-difusão só aparecem bandas de precipitação nitidamente visíveis quando a concentração de anticorpos acha-se presente, pelo menos entre 5 a 10 μg; Bier *et al.*[1]

Anticorpos neutralizantes dos efeitos letais presentes nos venenos botrópicos não existiam ou se achavam em quantidades indetectáveis nas amostras de plasma colhidas antes do início da imunização e mesmo nas amostras de plasma obtidas após a imunização de base. Entretanto, uma semana depois da 1.ª imunização de reforço houve um aumento abrupto nos níveis de anticorpos neutralizantes em todos os cavalos imunizados, 1,0ml de soro foi capaz de neutralizar os efeitos letais para o pombo em mais de 0,2mg e menos de 1,0mg da mistura de venenos botrópicos, à exceção do soro do cavalo n.º 650, cujo título foi superior a 1,0 mg/ml de soro. Estes títulos não variaram apreciavelmente ao longo de todo o processo de imunização de reforço (Tabela 3).

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F.; DIAS da SILVA, W. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):107-115, 1989.

TABELA 3
Titulação dos anticorpos neutralizantes das atividades letais presentes nos venenos botrópicos em cavalos imunizados com venenos botrópicos "in natura" ou pré-tratados com inibidores enzimáticos de baixo peso molecular ativos sobre o centro ativo de enzimas proteolíticas.

Mistura* de Venenos Botrópicos	Animal n.°	Anticorpos neutralizantes					
		Imunização de base	Imunização de reforço				
			1.ª dose	2.ª dose	3.ª dose	4.ª dose	5.ª dose
MVB*	89	**<0,2 mg	>0,2<0,5	>1,0<1,5	>0,8<1,0	<0,8	>0,2<0,5
	90	"	>0,2<0,5	>0,2<0,5	>0,5<0,8	>0,2<0,5	>0,2<0,5
	130	"	>0,2<0,5	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0<2,0
	375	"	>0,2<0,5	>0,5<0,8	>1,0	>1,0	>0,8<1,0
	385	"	<0,2	<0,2	<0,2	>0,2<0,5	>0,5<0,8
MVB-I*	550	**<0,2mg	>0,8<1,0	>1,0<1,5	>1,0<1,5	>0,8<1,0	>0,5<0,8
	594	"	>0,5<0,8	>0,8<1,0	>0,5<1,0	<0,5	>0,2<0,8
	650	"	>1,0	>1,5	>1,5	>1,5	>2,5<3,0
	588	"	>0,2<0,5	>0,8<1,0	>0,8<1,0	>0,8<1,0	>0,8<1,0
	590	"	>0,8<1,0	>0,8<1,0	<0,8	<0,8	>0,5<0,8

* MVB: mistura de venenos botrópicos contendo um volume de uma solução de veneno de *B.jararaca* a 5,0mg/ml em NaCl 0.15M e um volume de uma solução de venenos de *B.alternatus, B.cotiara, B.jararacussu, B.moojeni, B.neuwiedi* e *B.pradoi* a 5.0mg/ml contendo quantidades iguais de cada um destes venenos.

* MVB-I A solução MVB pré-incubada com 5 μM de p-Nitrofenil-p'-guanidino benzoato (NPGB), 5μM de fenil-metil-sulfonil fluoreto (PMSF) e 10 μM de ácido etileno-diamino tetracético (EDTA) a 32°, 30 min.

**Última diluição dando nítidas bandas de precipitação.

Via de regra, não há diferenças apreciáveis nos títulos de anticorpos quer nos animais imunizados com os venenos botrópicos "in natura" quer nos animais imunizados com a mistura de venenos botrópicos pré-tratada com inibidores enzimáticos. Assim, os inibidores NPGB e PMSF, compostos de baixo peso molecular, ativos sobre o centro ativo de enzimas proteolíticas, não interferiram com a imunogenicidade dos componentes dos venenos botrópicos responsáveis por seus efeitos letais. É importante ressaltar que os venenos botrópicos pré-tratados com os inibidores enzimáticos, ao contrário dos venenos "in natura", produziram lesões muito discretas no local da injeção que logo se cicatrizavam. Houve aumento da fração γ-globulinas após a 2.° imunização de reforço.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem: a) que a mistura de venenos botrópicos utilizada para a produção de soros terapêuticos deveria ser pré-tratada com inibidores enzimáticos de baixo peso molecular, visando reduzir as ações das enzimas proteolíticas presentes nesses venenos e assim reduzir as lesões locais que expoliam desnecessariamente a saúde dos animais em imunização; b) que o número de doses da imunização de reforço seja reduzido para duas, uma vez que não houve modifica-

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

Errata

Mem. Inst. Butantan,51(3), 1989.

Página	Onde se lê
112 Tabela 2	**Todos morreram com un
113 Tabela 3	**Última diluição dando nit

cm 1 2 3 4 5 6 7

Errata

Mem. Inst. Butantan,51(3), 1989.

Página	Onde se lê
112 Tabela 2	**Todos morreram com un
113 Tabela 3	**Última diluição dando nít

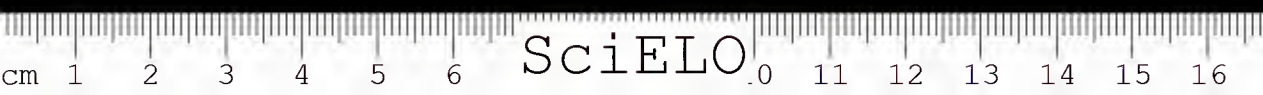
ções apreciáveis nos títulos de anticorpos ensaiados tanto pelos métodos imunoquímicos de ELISA e de imunodifusão como pelo método de neutralização das atividades letais dos venenos botrópicos.

ABSTRACT: The effect of protease active site direct inhibitors, the p-nitrophenyl-p'-guanidino benzoate (NPGB) and the phenyl-methyl-sulphonyl-fluoride (PMSF) or the chelator ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on the immunogenic properties of *Bothrops* venom components was studied. A group of 5 horses weighing 400-450 kg was immunized with *Bothrops* venoms preteated with 5 μM NPGP, 5 μM PMSF and 10mM EDTA. As control a similar group of horses was immunized with untreated venom. The animals were primed with 5 mg of venom in complete Freund's adjuvant and restimulated 4 months later with five boosters, each with 10 mg of venoms in NaC1 0,15 M, 8 days apart. During the immunization procedure (160 days long) each animal received 55 mg of venom. Serum samples were collected just before each venom injection and the antibodies levels evaluated by three methods: the micro-ELISA assay, the double immunodiffusion precipitin reaction and the venom lethal effects neutralization test. Antibodies against *Bothrops* venoms were absent before immunization, were present in low titers 4 months after priming with the venom incorporated in FCA, increasing after the first two boosters and plateauing thereafter. Pretreatment with NPGB, PMSF and EDTA did not interfered with the immunogenic properties of the venoms but blocks therir local tissue damage effects. These results lead to conclude that *Bothrops* venom pretreated with protease active site direct inhibitors should be used as substitute for crude venom as antigen and that the immunization schedule of horses for antivenoms production should be constituted by a priming with 5 mg of venom in FCA followed 3-4 month later by two boosters with 10 mg of venom in 0,15 M NaCl 8 days apart.
KEYWORDS: *Bothrops* venom. Proteolytic enzyme.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários e servidores do Setor de Imunização e Concentração e Fracionamento de Soros, pela colaboração prestada no decorrer do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIER, O.G.; DIAS da SILVA, W.; GOTZE, D.; MOTA, I. Antigen-antibody interaction. In: ———— Fundamentals of immunology. Berlin, Springer-Verlag, 1986. Cap. 7, p. 179.
2. BRAZIL, V. Dosagem do valor antitóxico dos serums antipeçonhentos. *Trib. méd.* Rio de Janeiro, *14* (3): 39 - 44, 1908.
3. DEUTSCH, H.F. & DINIZ, C.R. Some proteolytic activities of snake venoms. *J. Biol. Chem.*, *216*: 17 - 26, 1955.
4. DIAS da SILVA, W., EISELE, J.W.; LEPOW, I.H. Complement as mediator of inflammation. III. Purification of the activity with anaphylatoxin properties generated by interaction of the first four components and its identification as a cleavage product of C3. *J. exp. Med.*, *126*: 1027 - 1048, 1967.
5. IWANAGA, S. & SUZUKI, T. Enzymes in snakes venom. In: LEE, C.Y. *Snake venoms.* Berlin, Springer-Verlag, 1979. Cap. 21. p. 684-750. (Handbook of experimental pharmacology, *52*).
6. KOCHOLATY, W.F.; LEDFORD, E.B.; DAYLY, J.G.; BILLINGS, T.A. Toxicity and some enzymatic properties and activities in the venoms of *Crotalinae*, *Elapidae*, and *Viperidae*. *Toxicon*, 9: 31 - 138, 1971.
7. MEBS, D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. *Int. J. Biochem.*, *1*: 335 - 342, 1970.

HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A.K.; YAMAGUCHI, I.K.; LIMA, M.L.S.R.; MORAIS, J.F.; DIAS da SILVA, W. Venenos botrópicos pré-tratados com inibidores ativos para os sítios enzimáticos de proteases e com substância quelante preservam seu poder imunogênico. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):107-115, 1989.

8. OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta. path. microbiol. scand.*, *26*: 507, 1949.
9. ROCHA e SILVA, BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor releases from plasma globulin by snake venoms and trypsin. *Amer. J. Physiol.*, *156*: 261 - 273, 1949.
10. SLOTTA, k. Chemistry and biochemistry os snake venoms. *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.*, *12*:406, 1955.
11. THEAKSTON, R.D.G.; LLOYD-JONES, M.J.; REID, H.A. Micro-ELISA for detecting and assaying venom and antivenom-antibody. *Lancet*, *2*:639-641, 1977.

Mem. Inst. Butantan
51(3):117-121, 1989

PRESENÇA DE *HEPATOZOON PLIMMERI* (SAMBON, 1909) — COCCIDIA, HAEMOGREGARINIDAE — EM EXEMPLAR DE *BOTHROPS JARARACA* (WIED, 1824) — SERPENTES VIPERIDAE, CROTALINAE — MANTIDO EM CATIVEIRO

Persio De BIASI*
Rubens Pinto CARDOSO JUNIOR**
Selma Maria de Almeida SANTOS***

RESUMO: Os autores relatam a presença de *Hepatozoon plimmeri* (Sambon, 1909) em serpente vivípara, *Bothrops jararaca* (Wied, 1824), naturalmente infectada e mantida em cativeiro ao longo de oito anos. Comentam sobre os mecanismos de transmissão do parasita por ingestão de hospedeiros invertebrados (esporozoítos), predatismo, migração transplacentária (merozoítos e/ou endozoítos). Levantam a hipótese da existência no ciclo biológico de *Hepatozoon* de formas responsáveis por ciclos assexuados rápidos e lentos ou crônicos, lembrando taquizoítos e bradizoítos dos Eimeriinae.
UNITERMOS: *Hepatozoon*, Haemogregarinidae. Serpentes: *Bothrops jararaca*.

INTRODUÇÃO

Hepatozoon Miller 1908, tem, em seu ciclo biológico, a fase de reprodução assexuada em órgãos viscerais do hospedeiro vertebrado. Segundo Levine[8], ocorrem várias gerações assexuadas nas células viscerais, mas o número delas somente é conhecido em alguns casos.

Miller[9], ao estudar em laboratório o ciclo de *Hepatozoon muris* (Balfour, 1905)[1] numa população de ratos brancos, mencionou que a esquizogonia do parasita verifica-se no fígado do hospedeiro por três gerações e só, ocasionalmente, há uma 4.ª ou 5.ª geração.

Na infecção por predatismo, Landau[7], constatou que a esquizogonia

* Divisão de Biologia
** Seção de Venenos
*** Bolsista FEDIB
Instituto Butantan — C.P. 65 — 01051 — São Paulo — SP, Brasil.
Recebido para publicação em 02/06/1989 e aceito em 03/08/1989.

demanda pequeno número de dias, ao encontrar, no sangue de serpentes, merozoítos de *Hepatozoon* resultantes de divisão esquizogônica após o vigésimo dia de alimentação. Todavia, não foram citadas referências quanto ao número de gerações que ocorreram durante a presença do parasita no hospedeiro vertebrado.

Os experimentos, em geral, têm sido acompanhados durante curto espaço de tempo, não havendo menção de período em que a reprodução assexuada do *Hepatozoon* assegure a presença deste parasita na serpente.

Neste trabalho, relata-se a infecção por *H. plimmeri* (Sambon, 1909) em serpente *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) mantida em cativeiro durante oito anos.

MATERIAL E MÉTODOS

Serpente *Bothrops jararaca*, fêmea, recebida em 4/7/1980, na Seção de Venenos do Instituto Butantan, número NH-813 da série examinada para hematozoários, mantida no cativeiro (gaiola e sala adequadas) e alimentada com camundongos brancos provenientes do Biotério do Instituto Butantan, foi submetida a exame de sangue colhido através de pequena secção da cauda, na mesma data de sua recepção e, também, nos dias 20/7 e 04/10/1988.

Utilizaram-se as seguintes técnicas:

a) a fresco, por gota de sangue observada entre lâmina e lamínula;

b) esfregaços de sangue fixados com metanol e corados segundo Rosenfeld.

A classificação da parasitemia obedece ao seguinte critério:

a) infecção leve — esfregaços apresentando até um parasita para cada três campos ópticos (+);

b) infecção média — encontro entre o limite máximo de infecção leve até três parasitas por campo óptico (+ +);

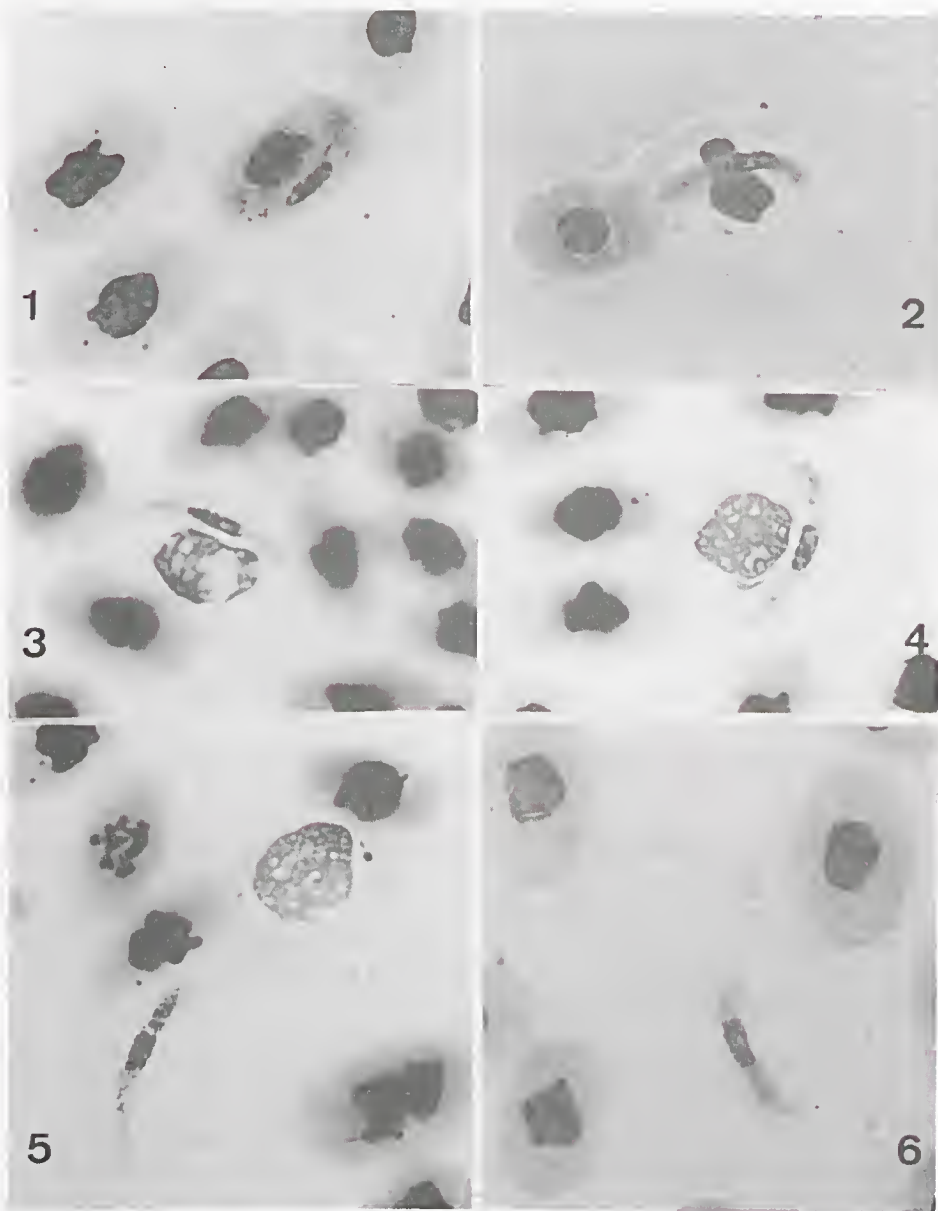
c) infecção grave — acima do índice máximo da infecção média (+ + +).

As fotos foram tomadas com fotomicroscópio Leitz Laborlu S, objetiva de 100 x e ocular de 10 x, com sistema automático de microfotografia Wild-SS e em seguida ampliadas. Filme Panatomic-X, ASA-32.

RESULTADOS

Em 4 de julho de 1980, no primeiro exame de sangue da serpente *B. jararaca*, foram encontrados merozoítos intra e exoeritrocíticos de *Hepatozoon* e, segundo critério adotado por Pessôa et al.[10,11], identificados como *Hepatozoon plimmeri* (Sambon, 1909).

A parasitemia mostrou-se grave (+ + +) aos primeiros exames. Decorridos oito anos de sobrevida da serpente no cativeiro, alimentada exclusivamente com camundongos brancos provenientes de biotério, novos exames de sangue revelaram a presença do *Hepatozoon* pelo encontro de merozoítos intra e exoeritrocíticos encapsulados e desencapsulados (figuras 1 a

6), em parasitemia classificada como leve (+), contando-se raros merozoítos nos esfregaços de sangue examinados.

Figuras 1 a 6 — Merozoítos de *Hepatozoon plimmeri* (Sambon, 1909) em esfregaços de sangue de *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) — NH. 813, corados com Rosenfeld (aumento 1.350 x).

1. Merozoíto intraeritrocítico;
2. Merozoíto intraeritrocítico, notando-se comprometimento de citoplasma do eritrócito;
3. Merozoíto intraeritrocítico, observando-se ausência de citoplasma no eritrócito, cujo núcleo apresenta-se aumentado e vacuolizado;
4. Idem do anterior;
5. Merozoíto exoeritrocítico abandonando a cápsula;
6. Merozoíto exoeritrocítico encapsulado.

COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

O ciclo biológico de *Hepatozoon* requer dois hospedeiros: um invertebrado para a reprodução sexuada e outro vertebrado para a assexuada.

Os mecanismos de transmissão em serpentes vivíparas, nas quais estão incluídas as serpentes *Bothrops*, ocorrem por esporozoítos através da ingestão do invertebrado infectado, por merozoítos e/ou endozoítos no predatismo (Landau)[7], e na transmissão transplacentária (Biasi et al.[3, 4] e Biasi[2]).

Citação bibliográfica mostra que as gerações do ciclo esquizogônico no hospedeiro vertebrado se repetem em pequeno número de dias (Landau)[7].
Em hospedeiro serpente, não há referência quanto ao número de gerações esquizogônicas possíveis de se realizar ao longo da sobrevida do *Hepatozoon* nesse vertebrado, pois todos os acompanhamentos nas pesquisas realizadas processaram-se por curto espaço de tempo.

A continuidade, num período de oito anos, de infecção na *Bothrops jararaca*, naturalmente infectada por *H. plimmeri*, evidencia a capacidade do *Hepatozoon* em manter-se presente no hospedeiro vertebrado (serpente) durante longo espaço de tempo, através de várias gerações assexuadas (esquizogônicas ou endogênicas) em infecção considerada crônica.

Os organismos parasitas encontrados no ciclo assexuado de *Hepatozoon* têm sido referidos como microzoítos (merozoítos) e macrozoítos (endozoítos), gerados respectivamente nos macro e microcistos. Os primeiros têm sido responsabilizados pela origem de gametócitos, enquanto que os segundos pela manutenção do ciclo assexuado. Nada tem sido mencionado pelos autores a respeito de formas merozoíticas e/ou endozoíticas causadoras de fases agudas e crônicas nas infecções por *Hepatozoon*.

A presente constatação leva à suspeita de que na fase de reprodução assexuada no hospedeiro vertebrado, o *Hepatozoon* no seu ciclo biológico tenha organismos que realizem ciclos reprodutivos rápidos e lentos, responsáveis, respectivamente, por infecção aguda e crônica, lembrando a existência de taquizoítos e bradizoítos de Eimeriinae como *Toxoplasma*, *Sarcocystis* e outros (Frenkel)[6].

Devido a presença durante longo período de tempo de *H. plimmeri* em *B. jararaca*, e aos mecanismos de transmissão do *Hepatozoon* no hospedeiro vertebrado (ingestão de esporozoítos, ingestão de mero e/ou endozoítos e transmissão congênita), os experimentos biológicos em laboratório devem ser realizados com serpentes examinadas e negativas para *Hepatozoon*. Se possível, utilizar não apenas técnicas de rotina para exame de sangue, mas também métodos como o xenodiagnóstico com emprego de hospedeiro invertebrado adequado para o desenvolvimento do ciclo esporogônico do *Hepatozoon*. Como já relatado anteriormente (Biasi et al.)[5], este hematozoário pode estar presente sob forma latente ou baixo índice de parasitemia.

BIASI, P. De; CARDOSO JÚNIOR, R.P.; SANTOS, S.M. de A. Presença de *Hepatozoon plimmeri* (Sambon, 1909) — Coccidia, Haemogregarininidae — em exemplar de *Bothrops jaracaca* (Wied, 1824). Serpentes, Viperidae, Crotalinae — mantido em cativeiro. *Mem. Inst. Butantan, 51*(3):117-121, 1989.

ABSTRACT: The authors relate the presence of *Hepatozoon plimmeri* (Sambon, 1909) in a naturally infected viviparous snake *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) maintained in captivity for 8 years. They comment on the transmission mechanisms of the parasite through ingestion of invertebrate hosts (sporozoites) predatory behaviour, transplacentary migration (merozoites and/or endozoites). They raise the hypothesis of the existence, in the biological cycle of *Hepatozoon*, of forms responsable for assexual cycles, rapid, slow or chronic, reminding tachyzoites and bradyzoites of Eimeriinae.
KEYWORDS: *Hepatozoon*. Haemogregarinidae. Snakes: *Bothrops jararaca*.

AGRADECIMENTOS

À Wild Leitz Instrumental de Precisão pelo acesso ao equipamento óptico e fotográfico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALFOUR, A. Haemogregarina of mammals, *H. jaculi* (*H. balfouri* Laveran). *J. trop. Med. Hyg.*, *8*(16): 241-244, 1905.
2. BIASI, P. De. Estudo sobre mecanismo de transmissão transplacentária "in vivo" de *Hepatozoon* Miller, 1908 em serpentes vivíparas Crotalinae (*Crotalus* Linnaeus, 1758 e *Bothrops* Wagler, 1824) e algumas observações nomenclaturais sobre os hospedeiros e parasitas. (Tese, 1986) não publicada.
3. BIASI, P. De; PESSÔA, S.B.; BELLUOMINI, H.E. Nota sobre a transmissão congênita de hemogregarinas em duas espécies de serpentes peçonhentas vivíparas. *Atas da Soc. Biol.*, Rio de Janeiro, *15*(1): 27-28, 1971.
4. BIASI, P. De; PESSÔA, S.B.; BELLUOMINI, H.E. Novas observações sobre transmissão congênita de hematozoários de serpentes vivíparas. *Mem. Inst. Butantan, 36*: 245-249, 1972.
5. BIASI, P. De; PESSÔA, S.B.; VIEIRA, F.C.G. Nota sobre longa latência de infecção por hemogregarina em uma serpente peçonhenta: *Bothrops moojeni* Hoge, 1965. *Atas da Soc. Biol.*, Rio de Janeiro, *15*(2): 71-73, 1972.
6. FRENKEL, J.K. Advances in the biology of Sporozoa. *Z. Parasitenk.*, *45*: 125-162, 1974.
7. LANDAU, I. Diversité des mecanismes assurant la pérennité de l'infection chez les sporozoaires coccidiomorphes. *Mém. Mus. Nat. D'Histoire Naturelle, N.S.* (Série A. Zoologie), *77*: 1-62, 1973.
8. LEVINE, N.D. Protozoan parasites of domestic animals and of man. 2. ed. 1973. Minneapolis Burgess Publishing Co., 1973.
9. MILLER, W.W. Hepatozoon perniciosum (n.g., sp.): a haemogregarine pathogenic for white rats with a description of the sexual cycle in the intermediate host a mite (*Laelaps echidninus*). *Bull. Hyg. Lab. Washington, 46*: 51, 1908.
10. PESSÔA, S.B. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. III. Novas observações sobre hemogregarinas de serpentes das Famílias Colubridae e Crotalidae. *Rev. bras. Biol.*, *27*(2): 159-164, 1967.
11. PESSÔA, S.B.; BELLUOMINI, H.E.; BIASI, P. De; SOUZA, D.M. Notas sobre hemogregarinas de serpentes brasileiras. XIV. Esporogonia da Hemogregarina da *Bothrops moojeni* Hoge, 1965, no *Culex* (*Culex*) *dolosus* (L. Arribálzaga, 1891). *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, *38*(4): 253-258, 1971.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. Somente serão aceitos trabalhos inéditos e que se destinem exclusivamente à revista. É proibida a reprodução com fins lucrativos. Os artigos de revisão serão publicados a convite da Comissão Editorial.
2. Os trabalhos deverão ser redigidos em português, inglês ou francês, datilografados preferencialmente em máquina elétrica, em espaço duplo em 3 (três) vias, em papel formato ofício e numerados no ângulo superior direito.
3. No preparo do original será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura: **Página de rosto:** título do artigo, nome(s) do(s) autor(es) e filiação científica. **Texto:** introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referência bibliográfica. **Material de referência:** resumos (em português e inglês); unitermos (palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo; devem ser incluídas até um limite máximo de três, em português e inglês).
4. As referências bibliográficas deverão ser ordenadas alfabeticamente e numeradas.
   Exemplos:
   Para livros: autor, título, edição, local de publicação, editor, ano, páginas.
   7. BIER, O. Microbiologia e imunologia. 24.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Para artigos: autor, título do artigo, título do periódico, volume, página inicial e final, ano.
   8. MACHADO, J.C. & SILVEIRA F.°, J.F. Obtenção experimenral da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem. Inst. Butantan, 40/41:** 1-9, 1976/77.
   As citações no texto devem ser por números-índices correspondentes às respectivas referências bibliográficas.
   Exemplos:
   ... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ... segundo vários autores[2,3,4]
5. As ilustrações (fotos, tabelas, gráficos etc.) deverão ser originais e acompanhadas de legendas explicativas. As legendas serão numeradas e reunidas em folha à parte. Os desenhos deverão ser a nanquim e as fotografias bem nítidas, trazendo no verso o nome do autor e a indicação numérica da ordem a ser obedecida no texto. As ilustrações deverão ser organizadas de modo a permitir sua reprodução dentro da mancha da revista (22 x 12,5cm).
6. Os artigos deverão conter no máximo 6 (seis) ilustrações (branco e preto). De cada trabalho serão impressas 50 (cinqüenta) separatas, sendo 10 para a Biblioteca do Instituto e 40 para os autores.
7. Os textos originais não serão devolvidos e os originais das ilustrações estarão à disposição dos autores.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. Manuscripts submitted to the Editorial Board should be unpublished texts and should not be under consideration for publication elsewhere. Reproduction for commercial purposes is not allowed. The Editorial Board will plan the publication of revision articles.
2. The original and two copies of papers should he typewritten in Portuguese, English or French, double spaced, on typing paper (31 x 21cm). Pages should be numbered consecutively at the upper right corner.
3. The following structure should be considered in the preparation of the manuscript: **Title page:** with article title, name of author(s), professional address. **Text:** with introduction, material and methods, results, discussion, conclusions, acknowledgments, references, abstracts (in Portuguese and English), and keywords. A maximal number of 03 keywords should be included in Portuguese and English.
4. References in alphabetical order should be numbered consecutively.
   Examples:
   Books
   7. BIER, O. Microhiologia e imunologia. 24.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Articles
   8. MACHADO, J.C. & SILVEIRA F.°, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem. Inst. Butantan, 40/41:** 1-9, 1976/77.
   Citations in the text should be identified by the reference number.
   Examples:
   ... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ... segundo vários autores[2,3,4]
5. Illustrations (photographs, tables, figures etc.) should be the originals and legends should be submitted typewritten on a separate sheet. Line-drawings should he with China ink and photographs must be of top quality. On the back of each figure or photograph the name of the author(s) should be lighly written and the number indicating the sequence in the text. Illustrations should fit in a page measuring 22 x 12,5cm.
6. No more than 6 illustrations will be accepted and photographs should be black and white. Fifty reprints of each article are provided without charge, and 10 will be kept at the library.
7. Submitted manuscripts will not be returned to the author(s) but the original illustrations are available to author(s) by request.